



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ANTONIO JOSÉ DE JESUS EVANGELISTA**

**ANTIBACTERIANOS B-LACTÂMICOS E VANCOMICINA COMO AGENTES  
POTENCIADORES DO CRESCIMENTO E VIRULÊNCIA DE *Candida* spp.**

**FORTALEZA-CE**

**2018**

**ANTONIO JOSÉ DE JESUS EVANGELISTA**

**ANTIBACTERIANOS  $\beta$ -LACTÂMICOS E VANCOMICINA COMO AGENTES  
POTENCIADORES DO CRESCIMENTO E VIRULÊNCIA DE *Candida* spp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rossana de Aguiar Cordeiro.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.

Área de concentração: Medicina.

Linha de pesquisa: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

**FORTALEZA-CE**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- E92a Evangelista, Antonio José de Jesus.  
ANTIBACTERIANOS B-LACTÂMICOS E VANCOMICINA COMO AGENTES POTENCIADORES DO CRESCIMENTO E VIRULÊNCIA DE *Candida* spp. / Antonio José de Jesus Evangelista. – 2018.  
102 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.  
Coorientação: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.
1. Antibacterianos B-lactâmicos. 2. Vancomicina. 3. *Candida*. 4. Biofilme. 5. *Caenorhabditis elegans*. I.  
Título.

CDD 610

---

**ANTONIO JOSÉ DE JESUS EVANGELISTA**

**ANTIBACTERIANOS  $\beta$ -LACTÂMICOS E VANCOMICINA COMO AGENTES  
POTENCIADORES DO CRESCIMENTO E VIRULÊNCIA DE *Candida spp.***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha (Coorientador)  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

---

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A meus pais, Maria Salomé (*in memoriam*) e José Antonio, a minha esposa Wytatyane Camboim e minha filha Nicole Camboim Evangelista, que nunca mediram esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pois sem Ele não sou e nunca serei nada!

A meus pais, José Antonio e Maria Salomé (*in memoriam*), que apesar de todas as dificuldades enfrentadas nos caminhos tortuosos da vida, sempre me apoiaram em toda a trajetória e são os responsáveis pela pessoa que sou. Apesar da ausência física da minha mãe, tenho convicção de que, onde ela estiver, está feliz por essa conquista que também é dela. Serei eternamente grato por tudo que fizeram por mim!

A minha esposa Wytatyane Camboim, que sempre me apoiou em todos os momentos e que abdicou parte de sua vida para que essa conquista fosse alcançada; saiba que sou muito grato a você! Além de ter me presenteado com nossa maior dádiva, Nicole. Espero que essa conquista, que é nossa, traga bons frutos para nossas vidas. Vocês duas são muito especiais para mim. Amo vocês! A seus pais Valdenor Camboim e Ana Karenina Camboim, que são meus grandes amigos, por quem tenho muito carinho e admiração. Obrigado por tudo!

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Rossana Cordeiro, não apenas pela orientação desse trabalho, mas pelo bom convívio desde o início e durante todo o período da pós-graduação. Sou grato por seus ensinamentos e pelo apoio em todos os momentos que precisei. Muito obrigado, de verdade! Ao meu coorientador Prof. Marcos Fábio que, para mim, é um exemplo de educador e profissional. Agradeço pelas conversas, orientações, cobranças e experiência repassadas ao longo desses anos. Ambos me guiaram desde o início do mestrado, e agora, concluindo o doutorado, agradeço por serem referências na minha formação acadêmica e profissional.

Aos demais professores que compõem o Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM dessa Instituição: Prof. Júlio Sidrim, agradeço por todos os momentos que necessitei de um direcionamento e o senhor, em todos os momentos, esteve disponível em ajudar. E a Prof<sup>a</sup>. Débora Castelo Branco, que além das conversas científicas sempre descontraídas, nunca mediu esforços para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Reginaldo Gonçalves que, desde a graduação, contribuiu diretamente para minha formação e realização desse objetivo, além de ser um dos meus precursores na Microbiologia Médica.

À Prof<sup>a</sup>. Lília Câmara pela ajuda nas etapas experimentais relacionadas à citometria de fluxo.

Aos professores que compuseram as bancas de qualificação e defesa desta tese, contribuindo substancialmente com suas recomendações para o abrilhantar deste trabalho.

Aos colegas que vim a conhecer durante a pós-graduação e que tornaram a convivência laboratorial mais agradável: Lucas Alencar, Jonathas Sales, Rosana Serpa, Jônatas Franco, Ana Raquel, Patrícia Leite, Gláucia Guedes, Jamille Alencar, Silviane Praciano, Edmilson Correia, Jaime David, Ewerton Caracas, Kleybson Sousa, Livia Galdino, Vandbergue Santos, Fernando Monteiro, entre outros.

Aos funcionários desta Instituição, sobretudo à Terezinha Rodrigues, técnica de laboratório do CEMM e, Ivone Fotenele e Rita de Cássia, secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – PPGCM.

À Central Analítica dessa Instituição e seus funcionários por proporcionar a aquisição das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE e seus colaboradores pelo apoio na execução dos experimentos com espectrometria de massas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo financiamento dessa pesquisa.

A todos vocês, muitíssimo obrigado!

*“Minha vida é andar por esse país  
Prá ver se um dia descanso feliz.  
Guardando as recordações  
Das terras onde passei  
Andando pelos sertões  
Dos amigos que lá deixei.  
Chuva e Sol, poeira e carvão  
Longe de casa, sigo o roteiro mais uma estação.  
E a saudade no coração...”*

*Trecho da música – Vida de viajante.*

*Luiz Gonzaga*



## RESUMO

A antibioticoterapia prolongada pode alterar a composição da microbiota das mucosas, aumentando o risco de surgimento de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos. Ademais, o uso de antibacterianos de amplo espectro pode interferir na relação de *Candida* com bactérias da microbiota favorecendo o estabelecimento de coinfeções que, por vezes, estão associadas ao surgimento de biofilmes. Nesse contexto, investigou-se o efeito de antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e vancomicina sobre o crescimento planctônico e virulência de *Candida* spp., bem como a ação de cefepime e amoxicilina e extratos de biofilme de *Escherichia coli* ATCC 25922 tratados com cefepime ou amoxicilina sobre o biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231. Para tanto, foram utilizados os antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos cefepime, imipenem, meropenem e amoxicilina e o glicopeptídeo vancomicina. Os antibacterianos foram testados nas concentrações correspondentes ao pico plasmático e duas vezes o pico plasmático de cada um, para o crescimento planctônico e, na concentração de pico plasmático para os testes com biofilme. Inicialmente, investigou-se o efeito dos antibacterianos sobre o crescimento planctônico de *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 por meio de contagem de Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL) e citometria de fluxo. Além disso, foi analisado o efeito dos antibacterianos sobre a produção de fatores de virulência *in vitro* (atividade proteolítica e fosfolipídica) bem como sobre a virulência *in vivo* das estirpes de *Candida* spp. usando *Caenorhabditis elegans* como modelo. Por fim, investigou-se o efeito de cefepime e amoxicilina e de extratos de biofilme de *E. coli* ATCC 25922 tratados com os antibacterianos citados sobre o biofilme de *C. albicans* ATCC 10231 formado em placas de poliestireno. Foram analisadas a produção de biomassa dos biofilmes (coloração por cristal violeta), atividade metabólica (redução do XTT), contagem de células viáveis (UFC/mL), ultraestrutura dos biofilmes (microscopia eletrônica de varredura), determinação do biovolume e espessura (microscopia confocal), atividade proteolítica das células sésseis (azalbumina como substrato), quantificação de carboidratos e proteínas (coloração com calcoflúor-white, vermelho do Congo, safranina e SYPRO<sup>®</sup> Ruby), composição da matriz (espectrometria de massas) e tolerância a antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol e caspofungina). Os resultados revelaram que os antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e vancomicina estimulam o crescimento planctônico e a atividade proteolítica, sem modificar a atividade fosfolipídica de *Candida* spp. Além disso, a vancomicina diante *C. parapsilosis* e amoxicilina face à *C. tropicalis* alteram o volume celular. Ademais, amoxicilina potencializa a virulência *in vivo* de *C. krusei* e *C. tropicalis* frente à *C. elegans*. Adicionalmente, amoxicilina e cefepime intensificam a produção de biofilme por *C. albicans* estimulando a produção de biomassa, atividade metabólica, contagem de células viáveis, biovolume, espessura, atividade proteolítica e quantificação de carboidratos dos biofilmes produzidos. Ainda, amoxicilina altera a composição da matriz do biofilme induzindo a síntese de Hsp70, em comparação ao controle. Porém, os extratos de biofilme de *E. coli* tratados com cefepime ou amoxicilina não interferem na produção de biofilme de *C. albicans*, quando comparado com os antibacterianos testados isoladamente. Por fim, a adição de amoxicilina torna o biofilme de *C. albicans* mais tolerante à caspofungina. Portanto, conclui-se que antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e vancomicina estimulam o crescimento planctônico e virulência de *Candida* spp. Além disso, cefepime e amoxicilina potencializam a produção de biofilme por *C. albicans*, além de a amoxicilina proporcionar aumento da tolerância do biofilme de *C. albicans* à caspofungina. Dessa maneira, essas descobertas podem ter impacto direto na fisiopatologia das infecções fúngicas invasivas em pacientes em risco.

**Palavras-chave:** Antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos. Vancomicina. *Candida*. Biofilme. *Caenorhabditis elegans*.

## ABSTRACT

Prolonged antibiotic therapy is likely to alter the mucosal microbiota composition, increasing the risk of opportunistic infections in immunocompromised patients. In addition, the use of broad-spectrum antibacterials may interfere with the relationship of *Candida* with bacteria in the microbiota, favoring the establishment of co-infections, which are sometimes associated with the appearance of biofilms. In this context, the effect of  $\beta$ -lactam antibiotics and vancomycin on the planktonic growth and virulence of *Candida* spp., as well as the action of cefepime and amoxicillin and *Escherichia coli* ATCC 25922 biofilm extracts treated with cefepime and amoxicillin on the biofilm produced by *C. albicans* ATCC 10231. For this purpose,  $\beta$ -lactam antibiotics cefepime, imipenem, meropenem and amoxicillin and glycopeptide vancomycin were used. Antibacterials were tested at concentrations corresponding to peak plasma concentration and 2-fold peak plasma concentration of each for planktonic growth, and at peak plasma concentration for biofilm tests. Initially, we investigated the effect of antibacterials on planktonic growth of *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 and *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 by counting Colony Forming Units per mL (CFU/mL) and flow cytometry. In addition, the effect of antibacterials on the production of virulence factors (proteolytic and phospholipid activity) as well as the *in vivo* virulence of *Candida* spp. using *Caenorhabditis elegans* as a model. Finally, the effect of cefepime and amoxicillin and *E. coli* ATCC 25922 biofilm extracts treated with the antibacterials cited on the biofilm of *C. albicans* ATCC 10231 formed on polystyrene plates were investigated. The biofilm biomass production (violet crystal staining), metabolic activity (XTT reduction), viable cells count (CFU/mL), biofilm ultrastructure (scanning electron microscopy), determination of biovolume and thickness (microscopy confocal), proteolytic activity of sessile cells (azoalbumin as substrate), quantification of carbohydrates and proteins (calcofluor-white staining, Congo red, safranin and SYPRO<sup>®</sup> Ruby), matrix composition (mass spectrometry) and antifungal tolerance (amphotericin B, fluconazole, itraconazole, voriconazole and caspofungin). The results showed that  $\beta$ -lactam antibiotics and vancomycin stimulate planktonic growth and proteolytic activity, without modifying the phospholipid activity of *Candida* spp. In addition, vancomycin against *C. parapsilosis* and amoxicillin against *C. tropicalis* alter the cell volume. In addition, amoxicillin potentiates the virulence of *C. krusei* and *C. tropicalis* against *C. elegans*. Additionally, amoxicillin and cefepime enhance biofilm production by *C. albicans* by stimulating biomass production, metabolic activity, viable cells count, biovolume, thickness, proteolytic activity and carbohydrate quantification of the biofilms produced. Furthermore, amoxicillin alters the composition of the biofilm matrix inducing the synthesis of Hsp70, in comparison to the control. However, *E. coli* biofilm extracts treated with cefepime or amoxicillin did not interfere in the biofilm production of *C. albicans* when compared to the antibacterials tested alone. Finally, the addition of amoxicillin makes the biofilm of *C. albicans* more tolerant to caspofungin. Therefore, it is concluded that  $\beta$ -lactam antibiotics and vancomycin stimulate the planktonic growth and virulence of *Candida* spp. In addition, cefepime and amoxicillin potentiate the biofilm production by *C. albicans*, in addition to amoxicillin, to increase the biofilm tolerance of *C. albicans* to caspofungin. Thus, these findings may have a direct impact on the pathophysiology of invasive fungal infections in patients at risk.

**Keywords:**  $\beta$ -lactam antibiotics. Vancomycin. *Candida*. Biofilm. *Caenorhabditis elegans*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> –	Desafios contra <i>Candida</i> no hospedeiro humano.....	26
<b>Figura 2</b> –	Estratégias de sobrevivência de <i>Candida</i> .....	27
<b>Figura 3</b> –	Mecanismos de resistência do biofilme de <i>Candida</i> .....	31
<b>Figura 4</b> –	Características morfológicas das colônias de <i>Candida</i> spp. em meio de cultura cromogênico CHROMagar™ <i>Candida</i> .....	36
<b>Figura 5</b> –	Interações entre <i>Candida</i> e bactérias.....	42
<b>Figura 6</b> –	Desenho experimental – Parte I.....	46
<b>Figura 7</b> –	Desenho experimental – Parte II.....	50
<b>Figura 8</b> –	Efeito dos antibacterianos em face do crescimento de <i>Candida</i> spp. em forma planctônica.....	58
<b>Figura 9</b> –	Efeito dos antibacterianos, vancomicina e amoxicilina, em face do volume celular de <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 e <i>C. tropicalis</i> CEMM 03-6-070 em crescimento planctônico analisado por citometria de fluxo.....	59
<b>Figura 10</b> –	Efeito dos antibacterianos em face da atividade proteolítica de <i>C. albicans</i> ATCC 10231, <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 e <i>C. krusei</i> ATCC 6258 em crescimento planctônico de 48 h.....	60
<b>Figura 11</b> –	Efeito de amoxicilina em face da virulência <i>in vivo</i> de <i>C. krusei</i> ATCC 6258 e <i>C. tropicalis</i> CEMM 03-6-070 em modelo de infecção experimental utilizando <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	61
<b>Figura 12</b> –	Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da biomassa do biofilme produzido por <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	62
<b>Figura 13</b> –	Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da atividade metabólica do biofilme produzido por <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	63
<b>Figura 14</b> –	Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da detecção de células viáveis do biofilme produzido por <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	64
<b>Figura 15</b> –	Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da morfologia e ultraestrutura do biofilme produzido por <i>C. albicans</i> ATCC 10231 analisado por microscopia eletrônica de varredura – Etapa de adesão: 6 h...	65
<b>Figura 16</b> –	Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da morfologia e ultraestrutura do biofilme produzido por <i>C. albicans</i> ATCC 10231 analisado por microscopia eletrônica de varredura – Biofilme em	

	formação: 24 h.....	66
<b>Figura 17</b>	– Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da morfologia e ultraestrutura do biofilme produzido por <i>C. albicans</i> ATCC 10231 analisado por microscopia eletrônica de varredura – Biofilme maduro: 48 h	66
<b>Figura 18</b>	– Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da morfologia e ultraestrutura do biofilme produzido por <i>C. albicans</i> ATCC 10231 analisado por microscopia confocal – Etapa de adesão: 6 h.....	68
<b>Figura 19</b>	– Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da morfologia e ultraestrutura do biofilme produzido por <i>C. albicans</i> ATCC 10231 analisado por microscopia confocal – Biofilme em formação: 24 h.....	68
<b>Figura 20</b>	– Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da morfologia e ultraestrutura do biofilme produzido por <i>C. albicans</i> ATCC 10231 analisado por microscopia confocal – Biofilme maduro: 48 h.....	69
<b>Figura 21</b>	– Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face do biovolume e da espessura do biofilme produzido por <i>C. albicans</i> ATCC 10231 analisado por microscopia confocal.....	70
<b>Figura 22</b>	– Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da atividade proteolítica produção do biofilme produzido por <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	71
<b>Figura 23</b>	– Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da quantificação de carboidratos do biofilme de <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	72
<b>Figura 24</b>	– Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da composição da matriz do biofilme produzido por <i>C. albicans</i> ATCC 10231 analisado por <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i> (MALDI-TOF MS).....	73
<b>Figura 25</b>	– Efeito de cefepime e amoxicilina em face da tolerância do biofilme produzido por <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 à caspofungina.....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Antibacterianos utilizados.....	45
<b>Tabela 2</b> – Antifúngicos utilizados.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP-Binding Cassete</i>
AMB	Anfotericina B
CAS	Casposfungina
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CHCA	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
FLC	Fluconazol
IFI	Infecção Fúngica Invasiva
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ITC	Itraconazol
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
MDP	Muramil dipeptídeo
MFS	<i>Major Facilitators Superfamily</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
PBP	<i>Penicillin-Biding Proteins</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PP	Pico plasmático
SAP	<i>Secreted Aspartic Proteases</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VRC	Voriconazol
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H hidróxido de tetrazólio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1	INFECCÕES FÚNGICAS INVASIVAS CAUSADAS POR LEVEDURAS.....	19
2.2	O GÊNERO <i>Candida</i> .....	22
<b>2.2.1</b>	<b>Aspectos morfofisiológicos</b> .....	23
<b>2.2.2</b>	<b>Patogenia e fatores de virulência</b> .....	25
2.2.2.1	Biofilme.....	29
2.3	INFECCÕES POR <i>Candida</i> : PRINCIPAIS FORMAS CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E TRATAMENTO.....	33
2.4	EFEITO DE ANTIBACTERIANOS SOBRE <i>Candida</i> E NA INTERAÇÃO COM A MICROBIOTA.....	38
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
3.1	OBJETIVO GERAL.....	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
4.1	LOCAIS DE ESTUDO.....	44
4.2	MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS.....	44
4.3	ANTIBACTERIANOS UTILIZADOS.....	45
4.4	DESENHO EXPERIMENTAL – PARTE I.....	45
<b>4.4.1</b>	<b>Efeito dos antibacterianos em face do crescimento planctônico de <i>Candida</i> spp.</b> .....	46
<b>4.4.2</b>	<b>Efeito dos antibacterianos em face do volume e complexidade celular de <i>Candida</i> spp. em crescimento planctônico</b> .....	47
<b>4.4.3</b>	<b>Efeito dos antibacterianos em face da atividade proteolítica de <i>Candida</i> spp.</b> .....	47
<b>4.4.4</b>	<b>Efeito dos antibacterianos em face da atividade fosfolipídica de <i>Candida</i> spp.</b> .....	48
<b>4.4.5</b>	<b>Efeito dos antibacterianos em face da virulência <i>in vivo</i> de <i>Candida</i> spp.</b> .....	48
4.5	DESENHO EXPERIMENTAL – PARTE II.....	49
<b>4.5.1</b>	<b>Efeito dos antibacterianos em face da biomassa e do biofilme produzido</b>	

por <i>Candida albicans</i> .....	50
<b>4.5.2</b> Efeito dos antibacterianos em frente da atividade metabólica do biofilme produzido por <i>Candida albicans</i> .....	51
<b>4.5.3</b> Efeito dos antibacterianos em face da detecção de células viáveis do biofilme produzido por <i>Candida albicans</i> .....	52
<b>4.5.4</b> Efeito dos antibacterianos em face da morfologia e ultraestrutura do biofilme produzido por <i>Candida albicans</i> .....	52
<b>4.5.5</b> Efeito dos antibacterianos em face da atividade proteolítica do biofilme produzido por <i>Candida albicans</i> .....	53
<b>4.5.6</b> Efeito dos antibacterianos em face da quantificação de carboidratos e proteínas do biofilme de <i>Candida albicans</i> .....	54
<b>4.5.7</b> Efeito dos antibacterianos em face da composição da matriz do biofilme produzido por <i>Candida albicans</i> .....	54
<b>4.5.8</b> Efeito dos antibacterianos em face da tolerância do biofilme de <i>Candida albicans</i> a antifúngicos.....	56
<b>4.6</b> ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
<b>5</b> RESULTADOS.....	57
<b>5.1</b> PARTE I.....	57
<b>5.1.1</b> Efeito dos antibacterianos em face do crescimento planctônico de <i>Candida spp.</i> .....	57
<b>5.1.2</b> Efeito dos antibacterianos em face do volume e complexidade celular de <i>Candida spp.</i> em crescimento planctônico.....	58
<b>5.1.3</b> Efeito dos antibacterianos em face da atividade proteolítica de <i>Candida spp.</i> .....	59
<b>5.1.4</b> Efeito dos antibacterianos em face da atividade fosfolipídica de <i>Candida spp.</i> .....	60
<b>5.1.5</b> Efeito dos antibacterianos em face da virulência <i>in vivo</i> de <i>Candida spp.</i> .....	61
<b>5.2</b> PARTE II.....	61
<b>5.2.1</b> Efeito dos antibacterianos em face da biomassa do biofilme produzido por <i>Candida albicans</i> .....	62
<b>5.2.2</b> Efeito dos antibacterianos em face da atividade metabólica do biofilme produzido por <i>Candida albicans</i> .....	63



5.2.3	Efeito dos antibacterianos em face da detecção de células viáveis do biofilme produzido por <i>Candida albicans</i> .....	63
5.2.4	Efeito dos antibacterianos em face da morfologia e ultraestrutura de biofilme produzido por <i>Candida albicans</i> .....	64
5.2.5	Efeito dos antibacterianos em face da atividade proteolítica do biofilme produzido por <i>Candida albicans</i> .....	70
5.2.6	Efeito dos antibacterianos em face da quantificação de carboidratos e proteínas do biofilme de <i>Candida albicans</i> .....	71
5.2.7	Efeito dos antibacterianos em face da composição da matriz do biofilme produzido por <i>Candida albicans</i> .....	72
5.2.8	Efeito dos antibacterianos em face da tolerância do biofilme de <i>Candida albicans</i> a antifúngicos.....	73
6	DISCUSSÃO.....	75
7	CONCLUSÃO.....	81
	REFERÊNCIAS.....	82
	APÊNDICES.....	96
	Apêndice A – <i>Breakpoints</i> de leitura dos antibacterianos em face de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	96
	Apêndice B – Controle de toxicidade dos antibacterianos e <i>Escherichia coli</i> OP50 diante <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	97
	Apêndice C – <i>Screening</i> da produção de biomassa do biofilme de <i>Candida albicans</i> em face dos antibacterianos.....	98
	Apêndice D – Efeito dos antibacterianos em face da atividade fosfolipídica de <i>Candida</i> spp.....	99
	Apêndice E – Efeito dos antibacterianos em face da virulência <i>in vivo</i> de <i>Candida</i> spp. em modelo de infecção experimental utilizando <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	100
	Apêndice F – Efeito dos antibacterianos em face da quantificação de carboidratos e proteínas do biofilme de <i>Candida albicans</i> usando vermelho do Congo, safranina e SYPRO® Ruby.....	101
	Apêndice G – Efeito de cefepime e amoxicilina em face da tolerância do biofilme de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 aos antifúngicos.....	102

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos comprovaram o aumento da frequência de infecções fúngicas invasivas (IFIs) em todo o mundo, as quais são atualmente consideradas importantes problemas de saúde pública. Tais infecções possuem grandes repercussões clínicas e costumam estar associadas a elevados índices de morbimortalidade, sobretudo entre os transplantados, neutropênicos graves, pacientes que fazem uso de doses elevadas de corticoides e indivíduos infectados pelo vírus HIV. As taxas de mortalidade decorrentes das IFIs nesses pacientes podem aproximar-se a 90% (HAHN-AST et al., 2010; MARIETTE et al., 2016). Outros fatores predisponentes para o desenvolvimento de IFIs, como antibioticoterapia prolongada, nutrição parenteral, quimioterapia e a quebra de barreiras cutâneo-mucosas, são também implicados como condições de risco para o surgimento de biofilmes (LYNCH; ROBERTSON, 2008; RAMAGE et al., 2009; SPITZER et al., 2017).

Apesar de mais de 50% das IFIs serem causadas por *Candida albicans*, mudanças drásticas na epidemiologia das infecções fúngicas têm sido observadas nos últimos anos. Dessa maneira, espécies de *Candida* não-*C. albicans* têm emergido como importantes patógenos em pacientes imunocomprometidos (MERSEGUÉL et al., 2015).

Embora os agentes de IFIs possuam determinantes de virulência bem definidos, na maioria das vezes, as condições de risco para desenvolvimento dessas infecções recaem sobre o *status* imune do hospedeiro e a iatrogenia medicamentosa. Nesse cenário, destaca-se a exposição prolongada aos antibacterianos (SAMONIS et al., 2013; 2006a; 2006b).

Os antibacterianos de amplo espectro são capazes de alterar a composição da microbiota das mucosas, permitindo a colonização desses sítios por *Candida* spp. Estudos em modelos experimentais murinos comprovam que a administração de diversas drogas, tais como amoxicilina-clavulanato, macrolídeos e carbapenems causam proliferação de *Candida* no trato gastrintestinal (SAMONIS et al., 2013; 2008; 2006a). Ademais, o uso de antibacterianos de amplo espectro pode interferir na relação de *Candida* com bactérias da microbiota favorecendo o estabelecimento de coinfeções que, por vezes, estão associadas ao surgimento de biofilmes. Nesse contexto, investigou-se o efeito de antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e vancomicina sobre o crescimento planctônico e virulência de *Candida* spp., bem como a ação de cefepime e amoxicilina e extratos de biofilme de *Escherichia coli* tratados com os antibacterianos citados, sobre o biofilme produzido por *C. albicans*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS CAUSADAS POR LEVEDURAS

Fungos oportunistas caracterizam-se pela capacidade em causar doença em pacientes imunologicamente desprotegidos, via imunossupressão e/ou imunodepressão. Constituem um grupo heterogêneo e filogeneticamente não relacionado de espécies com diferentes nichos ecológicos: comensais da microbiota do homem e/ou animais, fitopatógenos e saprófitas ambientais. A grande diversidade morfofisiológica observada nesse agrupamento tem profundos impactos no diagnóstico laboratorial, manejo terapêutico e, por conseguinte, no prognóstico das infecções causadas por esses agentes. São conhecidos como exemplos clássicos de leveduras oportunistas capazes de causar IFIs: *Candida albicans*, Complexo *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, *Trichosporon* spp. e *Rhodotorula* spp. (ESSER; KURZAI, 2014).

Estudos multicêntricos destacam que as espécies de *Candida* não-*C. albicans* têm emergido como importantes patógenos em pacientes imunocomprometidos, apesar de mais de 50% das IFIs serem causadas por *C. albicans* (LASS-FLÖRL, 2009; RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008). Análise retrospectiva de 672 episódios de candidemia na América Latina revelou que *C. albicans* foi o agente etiológico em aproximadamente 38% dos casos; *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata* foram responsáveis por aproximadamente 57% dos casos documentados (NUCCI et al., 2013). Além das alterações na prevalência dos agentes envolvidos em candidemias, tem-se observado também aumento da frequência de isolamento de agentes de IFIs como *Cryptococcus* sp. e outros gêneros outrora considerados não patogênicos, como *Trichosporon* spp. e *Rhodotorula* (LASS-FLÖRL, 2009; RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008).

O Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* é constituído por leveduras capsuladas responsáveis pela criptococose, uma micose sistêmica cosmopolita que geralmente está associada a pacientes imunodeprimidos, como é o caso dos indivíduos com aids. Segundo Park et al. (2009), estima-se que cerca de 957.900 casos de meningite criptocócica ocorrem a cada ano, resultando em 624.700 mortes anualmente. No Brasil, acredita-se que a meningite criptocócica representa cerca de 6% das infecções oportunistas em pacientes com aids, sendo a principal causa de doença infecciosa do sistema nervoso central nesses indivíduos (PEREIRA; BARROS, 2012).

A capacidade de o Complexo *Cryptococcus neoformans/C.gattii* infectar humanos e animais, está intimamente relacionada com a sensibilidade do hospedeiro e a produção de fatores de virulência, que são mecanismos que possibilitam ao fungo resistência à imunidade do hospedeiro, facilitando a proliferação e sobrevivência e, eventualmente, danificando órgãos e tecidos, ocasionando a criptococose. São vários os fatores de virulência produzidos pelo Complexo, sendo os principais, a expressão de cápsula, síntese de melanina, termotolerância a 37 °C, produção de enzimas, sobrevivência intracelular, aquisição de nutrientes, biofilme e resistência aos antifúngicos de uso terapêutico, entre outros (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

Os fungos do gênero *Trichosporon* são basidiomicetos leveduriformes capazes de formar blastoconídios, hifas, pseudo-hifas e artroconídios. São organismos amplamente distribuídos no solo e na água, podendo fazer parte da microbiota da pele e do trato gastrointestinal humano. O gênero é formado por cerca de 50 espécies, das quais 16 são reconhecidas como patógenos humanos (COLOMBO et al., 2011). São agentes envolvidos principalmente em infecções superficiais de pele e anexos, tais como onicomicose e piedra branca.

Nos últimos 30 anos, as IFIs causadas por *Trichosporon* têm sido reportadas com maior frequência em algumas populações-alvo (MICELI et al., 2011). A maioria desses casos ocorre em pacientes com neoplasias hematológicas, em especial aqueles com leucemia (BAYRAMOGLU et al., 2008; GIRMENIA et al., 2005; MATSUE et al., 2006; SUZUKI et al., 2010). A doença invasiva também tem sido relatada em indivíduos HIV positivos (ROMAN et al., 2014) e em pacientes que realizaram transplante de medula óssea (MORETTI-BRANCHINI et al., 2001). A fungemia é considerada a forma clínica mais comum das infecções invasivas por *Trichosporon* (MICELI et al., 2011). As infecções disseminadas por *Trichosporon* costumam apresentar prognóstico desfavorável, com taxas de mortalidade superiores a 80% (WALSH et al., 2004); ademais, resistência *in vitro* a anfotericina B – droga de escolha para o tratamento de micoses profundas – ocorre em várias espécies do gênero (CHAGAS-NETO et al., 2008).

Embora dados epidemiológicos precisos não estejam disponíveis, estima-se que as tricosporonoses correspondem a 10% de todos os casos confirmados de IFIs (PFALLER et al., 2007; WALSH et al., 2004). Resultados do projeto Artemis (*Artemis Global Antifungal Surveillance Program*), realizado com dados oriundos de 142 instituições em 41 países entre 1997 e 2005, revelaram que *Trichosporon* foi considerado o terceiro agente não-*Candida* mais

comum, correspondendo a 10,7% de mais de 8 mil isolados fúngicos analisados (PFALLER et al., 2007).

As leveduras do gênero *Rhodotorula* são basidiomicetos ubíquos no meio ambiente e que podem fazer parte da microbiota transitória e/ou permanente da pele e trato gastrointestinal humano. O gênero compreende mais de 40 espécies, contudo, apenas três figuram como patógenos humanos: *R. mucilaginosa*, *R. glutinis* e *R. minuta* (FORÉS et al., 2012). Os fungos do gênero *Rhodotorula* produzem um pigmento carotenoide característico, capaz de conferir coloração rósea ou avermelhada às colônias. Formam blastoconídios com brotamento multilateral, pseudohifas rudimentares e, ocasionalmente, apresentam cápsula discreta (MICELI et al., 2011).

Embora esses organismos sejam frequentemente reportados como saprófitas e/ou comensais, nos últimos vinte anos diversos relatos de IFIs causadas por *Rhodotorula* têm sido descritos e, desta forma, esses organismos são atualmente considerados patógenos emergentes (KIM; HYUN; RYU, 2013; MICELI et al., 2011; SPILIOPOULOU et al., 2012). Segundo dados do projeto Artemis, *Rhodotorula* foi considerado o 4º agente não-*Candida* mais comumente isolado (PFALLER et al., 2007). A maioria das IFIs causadas por esses agentes são fungemias associadas a cateteres, endocardite e meningite. A taxa de mortalidade decorrente de tais infecções é de aproximadamente 15% (TUON; COSTA, 2008). Pacientes com câncer ou aids estão em maior risco de aquisição da infecção (MICELI et al., 2011).

O manejo das IFIs representa um grande desafio terapêutico. Parte das dificuldades é inerente ao *status* imunológico do paciente e à dificuldade de reversão de algumas condições consideradas de alto risco, como neutropenia e uso de cateter venoso central. A manutenção de dispositivos invasivos em pacientes com candidemia, por exemplo, tem sido associada a falhas terapêuticas e complicações clínicas, além de maiores taxas de mortalidade (MUSKETT et al., 2011; PAPPAS et al., 2018; TSAI et al., 2011). As IFIs podem ser causadas por uma grande diversidade de agentes etiológicos – geralmente irreconhecíveis por meio de achados clínicos e fatores de risco – dificultando o manejo terapêutico dos pacientes acometidos, dada as diferenças no perfil de resistência desses microrganismos aos antifúngicos.

## 2.2 O GÊNERO *Candida*

A primeira documentação de que se tem conhecimento de leveduras do gênero *Candida* como patógenos é concedida a Langenbeck, que isolou em 1839, da cavidade oral, esse “novo patógeno” que atualmente assume o posto de mais importante levedura patogênica ao homem, *C. albicans* (KABIR; HUSSAIN; AHMAD, 2012).

Organismos do gênero *Candida* pertencem ao filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales, família Saccharomycetacea. São fungos pleomórficos, presentes em uma grande variedade de nichos ecológicos, com muitas espécies de grande relevância clínica, industrial e ambiental (CHAI; DENNING; WARN, 2010; MERSEGUEL et al., 2015; PAPON et al., 2013; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).

Os fungos do gênero *Candida* normalmente são encontrados como organismos comensais no corpo humano, fazendo parte da microbiota da pele, trato gastrointestinal e genitourinário, podendo ainda ser encontrados no trato respiratório superior (MERSEGUEL et al., 2015; PAPON et al., 2013). Leveduras desse gênero podem ser encontradas nos mais variados substratos, sendo micro-organismos heterotróficos, aeróbios e fermentadores, podendo ainda se desenvolver sob condições de microaerofilia (SCHULZE; SONNENBORN, 2009).

Nas últimas duas décadas, tem-se observado um aumento na incidência das infecções por *Candida*, sendo estas consideradas como a principal causa de infecções fúngicas em seres humanos (FOURNIER et al., 2011). Sob determinadas condições que enfraqueçam sobremaneira o sistema imunológico do hospedeiro, a exemplo de longos e repetidos episódios de neutropenia, neoplasias, ou ainda, transplantes de órgãos e prematuridade, esses micro-organismos comensais podem converter-se em patógenos oportunistas. Como consequência, surgem diversos tipos de infecções que vão desde superficiais crônicas, até infecções invasivas. Estas últimas apresentam elevadas taxas de mortalidade, que podem chegar a 50% nos adultos e até 30% em crianças (CHANDRA, J; MUKHERJEE, 2015; LIONAKIS; NETEA, 2013).

Das espécies fúngicas associadas às infecções oportunistas em seres humanos, inquestionavelmente, *C. albicans* é a principal espécie do gênero relacionada a esses tipos de infecções. Dessa maneira, *C. albicans* é a quarta espécie de micro-organismo mais isolada a partir de hemoculturas nos Estados Unidos da América (PFALLER, 2012).

Das mais de 200 espécies catalogadas de *Candida*, pouco mais de 30 já foram isoladas de infecções em humanos. Dessas, destacam-se *C. albicans*, Complexo *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, responsáveis por cerca de 92% das infecções por *Candida* spp. (MERSEGUEL et al., 2015; PAPON et al., 2013; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).

*C. albicans* é uma levedura polimórfica diploide com oito cromossomos e que pode se replicar em condições anaeróbicas, a exemplo do cólon humano (KRUPPA, 2009). Cresce de maneira vegetativa em pelo menos três formas morfológicas diferentes: leveduriforme ou blatoconídio, pseudo-hifa e hifa verdadeira. O balanço entre essas diferentes formas afeta a morfologia da colônia e as mudanças ocorridas ao longo desse processo e é conhecido como *switching* fenotípico (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

As espécies de *Candida* não-*C. albicans*, a exemplo do Complexo *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, são consideradas patógenos emergentes e têm obtido destaque no cenário mundial como causadoras de infecções em ambiente hospitalar, sobretudo em pacientes imunodeprimidos internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008). O Complexo *C. parapsilosis*, de maneira geral, está relacionado à candidemia em neonatos e pacientes transplantados. Esse complexo de espécies, constituído por *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, possui grande capacidade de produzir biofilmes, sendo relacionado a surtos de candidemia associados com cateter venoso central e nutrição parenteral (ALANGADEN, 2011). *C. krusei* é uma espécie intrinsecamente resistente ao fluconazol e, dessa forma, é responsável por um alto índice de mortalidade. Está relacionada a pacientes transplantados de células da medula óssea, pacientes que passaram por cirurgia gastrointestinal e exposição prévia ao fluconazol (HORN et al., 2009; SIPSAS et al., 2009). *C. tropicalis* por sua vez, está associada a pacientes com doenças hematológicas graves, seguida de neutropenia e mucosite (HORN et al., 2009).

### **2.2.1 Aspectos morfofisiológicos**

Espécies de *Candida* são leveduras unicelulares, que se reproduzem por brotação e/ou fissão. Podem apresentar um estágio filamentoso, com produção de hifas verdadeiras e/ou pseudo-hifas e, essa mudança morfológica pode ocorrer tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, repercutindo diretamente sobre a virulência fúngica (KABIR; HUSSAIN; AHMAD, 2012). A morfogênese das hifas é desencadeada por sinais ambientais que se assemelham a condições de crescimento desfavoráveis ou indicam a presença de um ambiente hostil. Esses

fatores incluem temperatura elevada, potencial hidrogeniônico (pH) neutro, escassez de nutrientes, concentração de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, densidade celular e contato com superfícies físicas. Já, temperaturas baixas, pH ácido e concentrações elevadas de glicose, propiciam a produção da forma unicelular desses fungos (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).

Quanto às exigências nutricionais de *Candida* para a sobrevivência, adaptação metabólica e para a proliferação em determinados nichos no hospedeiro, as células fúngicas necessitam ter acesso a macronutrientes, como os carboidratos e aminoácidos, e micronutrientes, como os íons. A disponibilidade de nutrientes difere substancialmente entre diversos nichos no hospedeiro. Por exemplo, em indivíduos saudáveis, *Candida* é predominantemente encontrada como parte da microbiota gastrointestinal, considerado um nicho excepcionalmente rico em nutrientes. Mesmo assim, as células de *Candida* ainda têm que competir com outros membros da microbiota, como as bactérias, para obtenção de nutrientes (DADAR et al., 2018).

Um fator determinante para a aquisição de nutrientes por *Candida* é o pH. No hospedeiro humano, o pH difere drasticamente de acordo com o sítio anatômico. Embora o pH no sangue e nos tecidos seja basicamente neutro (pH 7,4, aproximadamente) a cavidade vaginal humana é ácida (pH 4) e o pH ao longo do trato digestivo difere significativamente, variando de pH 2 a pH 8. Diferentemente das bactérias, os fungos têm predileção por um pH levemente ácido para o seu crescimento. Dessa maneira, a absorção de nutrientes é conduzida sumariamente pelo gradiente de prótons, que não funciona em pH básico. Além disso, a estabilidade das proteínas e a função enzimática são afetadas pelo pH. Por exemplo, a função de proteínas fúngicas importantes para o metabolismo, pode ser afetada negativamente pelo pH alcalino, representando um *stress* para *C. albicans* (DANTAS et al., 2016).

Quanto à aquisição de macronutrientes, *Candida* pode metabolizar uma variedade de açúcares e aminoácidos diferentes, sendo capaz de usar os nutrientes liberados de forma eficiente. Os açúcares, sobretudo a glicose, são as fontes de carbono mais utilizadas por *Candida*. A presença de glicose estimula a expressão de genes envolvidos na resistência ao estresse oxidativo. Por outro lado, na ausência de glicose, *C. albicans* possui a capacidade de usar aminoácidos ou poliamina como fonte de carbono que acarreta diretamente na produção e excreção de nitrogênio sob a forma de amônia. Como consequência, a amônia proporciona a elevação do pH extracelular circundante, servindo de gatilho para a indução da morfogênese, acarretando na transição levedura-hifa. Além disso, a adaptação a diferentes fontes de carbono



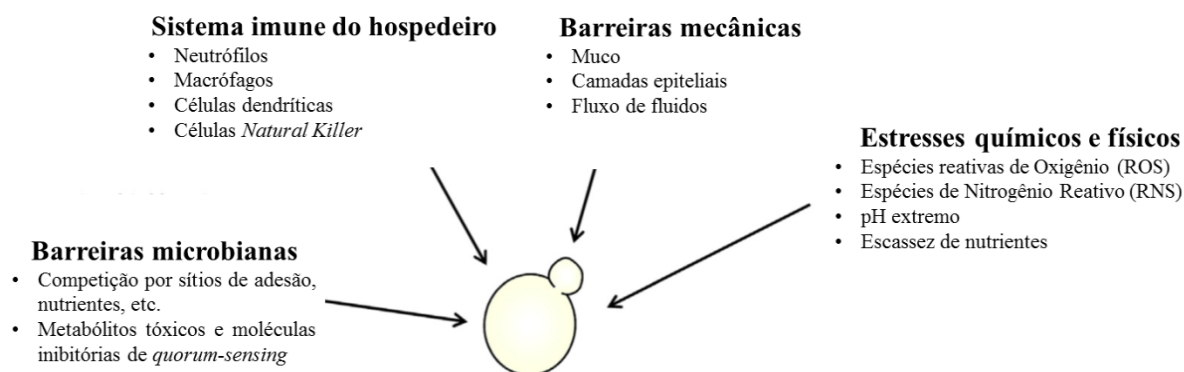
influencia a arquitetura e funcionalidade da parede celular, modulando as respostas ao *stress* e à resistência aos antifúngicos (DANTAS et al., 2016).

Os micronutrientes, como ferro, zinco, cobre e manganês, estão disponíveis somente em pequenas quantidades no hospedeiro. Assim, *Candida* necessita ser capaz de adaptar-se à escassez dessas substâncias e captar ativamente os micronutrientes quando em contato com o hospedeiro. Estes metais traços são indispensáveis para o metabolismo e para o crescimento fúngico, desempenhando função de cofatores de muitas proteínas e enzimas. Durante o processo evolutivo, *Candida* desenvolveu diversas estratégias para adquirir esses micronutrientes de moléculas hospedeiras (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).

Quanto à captação do ferro, *C. albicans* possui três formas principais de aquisição que incluem um sistema redutor, a absorção por sistema sideróforo e um mecanismo de captação de ferro proveniente do grupamento heme das hemácias. O sistema redutor permite que *C. albicans* adquira o ferro da ferritina e transferrina do hospedeiro, ou o ferro livre do meio ambiente. Embora *C. albicans* não possua a capacidade intrínseca de produção de sideróforos, em contrapartida possui o sistema de transporte de sideróforo Sit1/Arn1 que pode utilizar sideróforos de outros micro-organismos que estimulem a captação do ferro. Além disso, *C. albicans* pode expressar hemolisinas que lisam glóbulos vermelhos, liberando, assim, a hemoglobina e outras proteínas do grupamento heme. O ferro captado, participa de diversas vias metabólicas e é importante para a expressão de diversos genes de adesão, afetando, assim, o passo inicial da formação de biofilmes, um dos principais fatores de virulência de *Candida* (SELLAM; WHITEWAY et al., 2016).

### **2.2.2 Patogenia e fatores de virulência**

Espécies de *Candida* sofrem diversos desafios quando em contato com um hospedeiro (Figura 1) e, sob certas circunstâncias, podem alterar seu estilo de vida comensal, tornando-se patógeno. Os mecanismos envolvidos durante esta transição não são totalmente compreendidos. Porém, podem ser apoiados na capacidade de *Candida* expressar diversos fatores importantes que lhes propiciam e facilitam a multiplicação de suas células no hospedeiro, possibilitando o processo de colonização e eventualmente a infecção. Esses fatores relacionam-se, sobretudo, à adesão e à invasão ao tecido do hospedeiro, pleomorfismo, liberação de exoenzimas hidrolíticas e produção de biofilme (NEGRI et al., 2010).

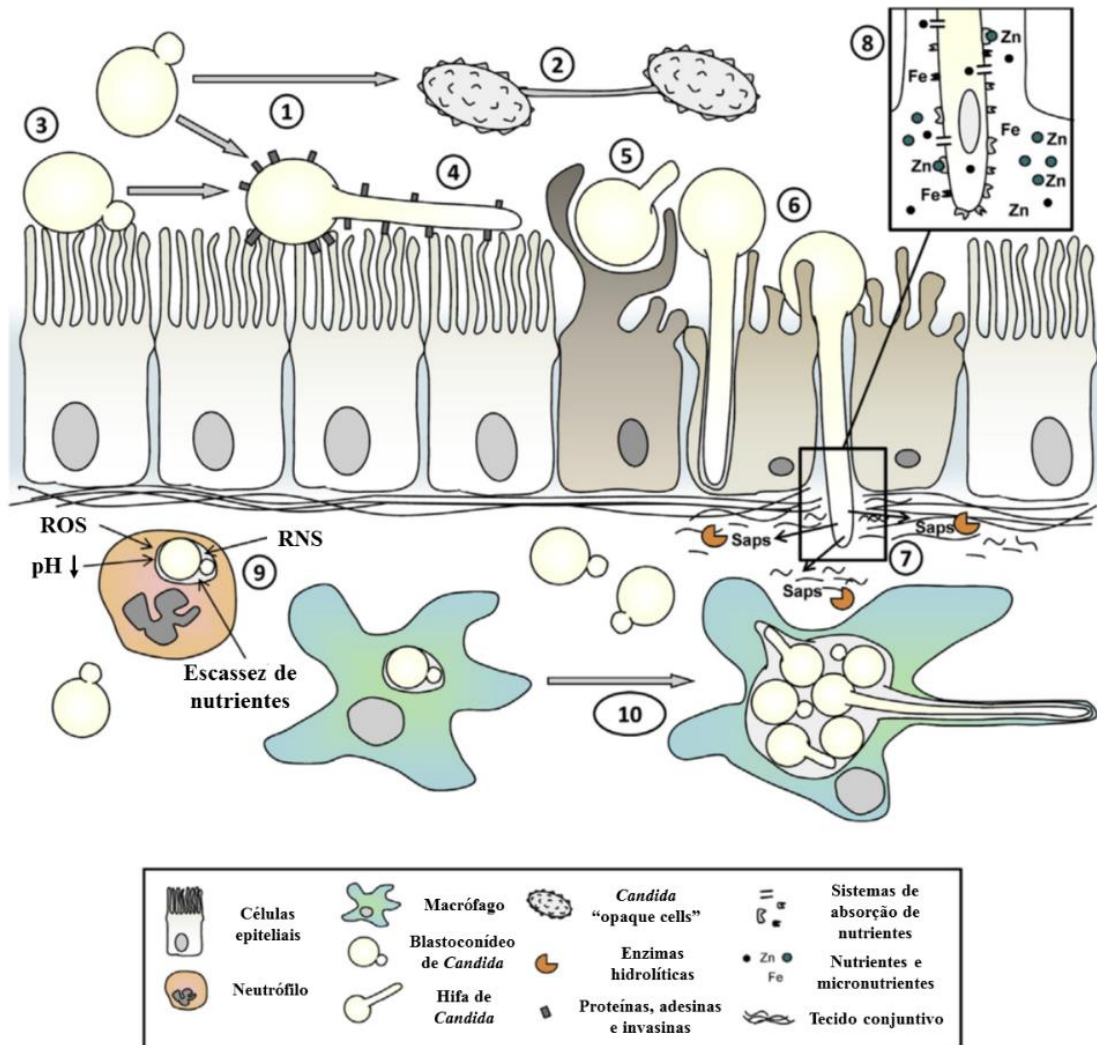


**Figura 1:** Desafios contra *Candida* no hospedeiro humano. Fonte: Traduzido de Polke, Hube e Jacobsen (2015).

As células de *Candida* produzem um vasto arsenal de adesinas que proporcionam uma forte ligação à superfície epitelial. O fato de *C. albicans* possuir tantas adesinas diferentes pode ser um dos motivos fundamentais pelo qual a levedura é considerada um patógeno tão flexível. O arsenal de adesinas é provavelmente necessário durante o período de comensalismo, nas diferentes situações de infecção e para o contato com diferentes tipos celulares (outras células de fungos, bactérias, células epiteliais, células endoteliais, etc.), promovendo, assim, adesão em múltiplos nichos dentro do hospedeiro. A adesão às células epiteliais do hospedeiro é um forte gatilho para a formação de hifas, que acelera o processo de colonização e invasão tecidual (NAGLIK et al., 2017).

Embora alguns estudos tenham relatado que as células leveduriformes de *C. albicans* possam invadir células epiteliais até certo ponto, por um processo denominado de cavitação, a invasão tecidual geralmente é atribuída às hifas. Contudo, leveduras e hifas, desempenham importantes funções durante a infecção por *C. albicans* com papéis distintos das diversas morfologias, durante diferentes etapas de infecção. Ambas as formas de crescimento podem ser encontradas no decorrer das infecções sistêmicas. As formas de levedura são fundamentais para a disseminação pela corrente sanguínea, ao passo que a formação das hifas está associada à invasão tecidual. A formação de hifas promove tanto a invasão nos tecidos, quanto evita que as células de *Candida* sejam englobadas por macrófagos e neutrófilos, contribuindo para o aumento da virulência do fungo (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009). O processo pelo qual uma levedura vem a produzir hifas pode ser influenciado por uma variedade de condições ambientais incluindo resposta fisiológica à temperatura de 37 °C, pH igual ou superior a 7,0, concentração de CO<sub>2</sub> de 5,5 % e presença de fonte de carbono. As hifas aderidas podem crescer ao longo de superfícies mediadas por um mecanismo por "detecção de contato". Isso permite que *Candida* encontre pontos fracos na barreira epitelial,

por exemplo, células epiteliais danificadas e camadas celulares rompidas. Ou permite ainda que as hifas reconheçam as junções de contato intracelulares facilitando a invasão por entre as células do hospedeiro (Figura 2) (SELLAM; WHITEWAY et al., 2016).



**Figura 2:** Estratégias de sobrevivência de *Candida*. (1) Flexibilidade morfológica; (2) *switching* fenotípico *white-to-opaque* e *mating*; (3) filamentação induzida por contato; (4) expressão de adesinas associadas à hifa e (5) invasão em células hospedeiras por endocitose induzida ou (6) penetração ativa; (7) secreção de enzimas hidrolíticas, por exemplo, proteases aspárticas secretadas (Saps) e fosfolipases que possibilitam a penetração e a ruptura do tecido; (8) aquisição de nutrientes e micronutrientes de células hospedeiras, por exemplo, sistemas de absorção de zinco e ferro; (9) vias de resposta ao estresse facilitando a resistência a condições ambientais adversas, por exemplo, espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies de nitrogênio reativo (RNS), baixo pH e escassez de nutrientes; (10) modificação ativa do fagossoma para promover o crescimento das hifas, facilitando dano de macrófagos e escape. Fonte: Traduzido de Polke, Hube e Jacobsen (2015).

A invasão tecidual pelas hifas ocorre por duas vias diferentes: endocitose induzida e penetração ativa. A via mediada por endocitose induzida é inteiramente ligada ao hospedeiro e não necessita de atividade fúngica, uma vez que, até mesmo as células de levedura mortas são englobadas pelas células do hospedeiro. No entanto, a absorção de elementos fúngicos

precisa de um estopim, iniciado por uma proteína de superfície da célula fúngica e reconhecida por um receptor na superfície da célula hospedeira, um processo semelhante aos que ocorrem durante a invasão bacteriana. A adesina Als3 é tida como a principal molécula de adesão e invasão de *C. albicans*, configurando como o principal ligante à célula do hospedeiro por meio dos receptores denominados caderinas (E-caderina em células epiteliais orais e N-caderina nas células endoteliais). Estudos sugerem que a endocitose induzida ocorre durante os primeiros estágios de invasão tecidual, contribuindo com aproximadamente 25% da atividade de invasão total *in vitro* (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).

Em contrapartida com a endocitose induzida, a segunda via de invasão de *C. albicans*, a penetração ativa, é inteiramente executada pelo fungo, pois até mesmo células hospedeiras inativas ou mortas são invadidas por esta via. Todos os tipos de células hospedeiras já investigadas, incluindo células intestinais, são invadidas por penetração ativa, sendo considerada a principal via de invasão por *Candida*. Assim como na endocitose induzida, apenas as hifas são capazes de invadir por meio da penetração ativa. Conseqüentemente, as células mutantes de *C. albicans* com redução da capacidade de formação de hifas são incapazes de invadir por ambas as vias. Os mecanismos de penetração ativa ainda não estão claramente elucidados. Acredita-se que uma mistura de forças físicas, provavelmente baseadas em pressão e atividade de enzimas hidrolíticas seja necessária para a penetração ativa (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).

A produção de enzimas hidrolíticas, como proteases e fosfolipases, está diretamente relacionada com o metabolismo celular e desempenha papel crucial na sobrevivência fúngica. Essas enzimas são consideradas importantes fatores de virulência, uma vez que promovem o crescimento celular, além de favorecerem a adesão e a penetração em tecidos, proporcionando a disseminação do fungo no organismo do hospedeiro. As principais enzimas proteolíticas produzidas por *Candida* são as proteases aspárticas secretadas (SAP). Essas proteases podem degradar um grande número de substratos celulares, incluindo proteínas estruturais do tecido do hospedeiro, como o colágeno e, clivar diversas proteínas relacionadas ao sistema imunológico, como imunoglobulinas e proteínas do sistema complemento. Já as fosfolipases constituem um grupo heterogêneo de enzimas que compartilham a habilidade de hidrolisar uma ou mais ligações de éster em glicerofosfolipídios. Todas as fosfolipases têm como substrato moléculas de fosfolipídios; porém, cada enzima tem a habilidade de clivar uma ligação de éster específica. As fosfolipases contribuem diretamente para a penetração, injúria e lise das células do hospedeiro. *Candida* secreta variedades de enzimas fosfolipídicas, sendo

as fosfolipases B as mais relacionadas com a virulência da levedura. Estudos têm comprovado que a expressão enzimática de proteases e fosfolipases é substancialmente aumentada quando as células fúngicas se encontram vivendo em comunidade, na forma de biofilme (JAFARI et al., 2017; SHIRKHANI et al., 2016).

#### 2.2.2.1 Biofilme

Nos últimos anos, tornou-se cada vez mais evidente que o crescimento de micro-organismos na forma planctônica *in vivo* é a exceção, e não a regra, quando em contato com o hospedeiro. Estima-se que, até 80% de todos os micro-organismos crescem como comunidades sésseis aderidas a uma superfície ao invés de células isoladas, constituindo uma parcela significativa de todo o microbioma humano. Além disso, grande parte das infecções surge de biofilmes patogênicos, os quais estão relacionados a um aumento da patogenicidade, acarretando em sérios problemas de saúde, com maiores taxas de mortalidade dos indivíduos acometidos. Dispositivos médicos rotineiramente utilizados em contextos clínicos, como catéter venoso central ou urinário, válvulas cardíacas artificiais, articulações protéticas ou próteses dentárias, fornecem um ambiente ideal para que as células microbianas sobrevivam em comunidade, eventualmente causando infecção subsequente (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

Biofilmes são comunidades microbianas dinâmicas, de estrutura tridimensional aderidas a uma superfície biótica ou abiótica, cujas células encontram-se circundadas por uma matriz extracelular polimérica secretada pelas próprias células (RAMAGE et al., 2012). A eficiência da formação de biofilmes de *Candida* em um substrato depende de diversos fatores, entre eles, a textura da superfície (por exemplo, rugosidade, hidrofobicidade), condições ligadas ao meio ambiente (por exemplo, disponibilidade de nutrientes, forças de cisalhamento, disponibilidade de O<sub>2</sub>, níveis de CO<sub>2</sub> e pH), a capacidade intrínseca do fungo de formar biofilmes e a pressão exercida pelas células imunes do hospedeiro (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).

A formação de biofilme de *Candida* é um processo multifatorial e sequencial que envolve basicamente quatro etapas de formação, começando com a adesão de células individuais a uma superfície (etapa de adesão). Este contato inicial é mediado por fatores físico-químicos, como interações eletroquímicas, e posteriormente por adesinas de superfície celular, como ocorre no contexto da adesão aos tecidos do hospedeiro. A adesão em biofilmes

envolve o contato com o substrato, bem como a aderência célula a célula durante a formação do biofilme. As células aderidas começam a se proliferar, formando uma camada delgada de células que fornece a base para um maior desenvolvimento do biofilme (etapa de formação). Subsequentemente, o biofilme cresce e amadurece, evento decorrente da produção de pseudo-hifas e hifas. Ocorre, ainda, o início da secreção de uma matriz extracelular polimérica, produzida pelas próprias células fúngicas associadas ao biofilme (etapa de maturação). A superfície do biofilme maduro fornece, então, a base para a dispersão e disseminação decorrente da liberação de células, sobretudo leveduriformes, no ambiente (etapa de dispersão) (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

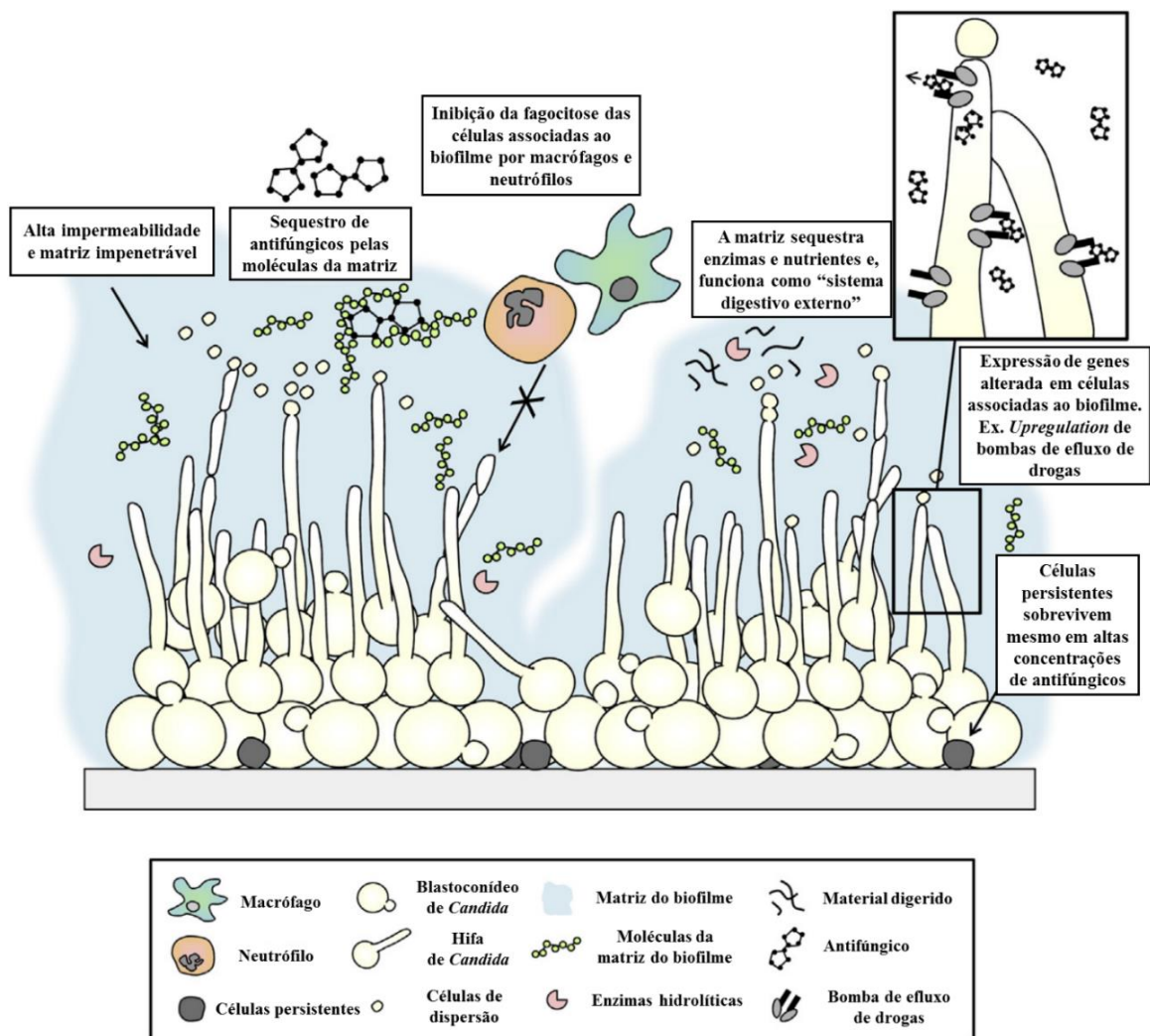
Durante o desenvolvimento do biofilme, as células de *Candida* modulam a expressão de diversos genes relacionados à síntese da matriz extracelular. A matriz – que pode corresponder até 85% do volume total do biofilme – apresenta grande dinamismo químico e espacial, pois, além de preservar a viabilidade celular, a estrutura está diretamente envolvida com as características mais importantes dos biofilmes fúngicos: a invulnerabilidade à resposta imune do hospedeiro e a resistência aos antifúngicos. Esta última característica é considerada um fenômeno complexo e multifatorial, podendo ser induzida após exposição a um dado composto ou resultante de mudanças genéticas irreversíveis (PARKER et al., 2014; RAMAGE et al., 2012).

A matriz extracelular do biofilme desempenha papel crucial na proteção das células fúngicas contra a resposta imunológica do hospedeiro, além de ser considerada um dos principais mecanismos de resistência aos antifúngicos. A matriz possui constituição química complexa, formada em sua maioria por proteínas e carboidratos, além de lipídios, hexosamina, fósforo, ácido urânico e DNA extracelular. Curiosamente, as proteínas presentes na matriz do biofilme de *Candida*, não são aquelas associadas à parede celular, mas sim, fatores secretados e envolvidos no metabolismo de carboidratos e aminoácidos. Isso sugere que a matriz do biofilme de *Candida* também pode funcionar como um “sistema digestivo externo”, que aumenta a captação de moléculas extracelulares, servindo como fonte de energia para as células associadas ao biofilme. Além disso, a matriz desempenha uma característica de barreira físico-química de proteção, impedindo a penetração dos antifúngicos e componentes do sistema imune do hospedeiro. Ainda, desempenha um papel de quelante, sequestrando as drogas, fazendo que sejam necessárias concentrações mais elevadas dos fármacos para exercer efeito. Compreender os mecanismos envolvidos na síntese da matriz



dos biofilmes é o ponto chave para o desenvolvimento de estratégias antifúngicas (RAMAGE et al., 2012; ZARNOWSKI et al., 2014).

De maneira geral, além da matriz extracelular, os mecanismos envolvidos no fenômeno de resistência aos antifúngicos em biofilme são: aumento da densidade celular; estado fisiológico em que as células se encontram; a presença de células persistentes; superexpressão e/ou mutações de genes relacionados aos alvos das drogas e bombas de efluxo (Figura 3) (RAMAGE et al., 2012).



**Figura 3:** Mecanismos de resistência do biofilme de *Candida*. O crescimento na forma de biofilmes, uma comunidade multicelular de ultraestrutura tridimensional complexa, está associada a uma alta tolerância intrínseca a várias condições estressantes, por exemplo, tratamento antifúngico, mecanismos de defesa do sistema imunológico do hospedeiro, estresses físicos e químicos. Alguns mecanismos de resistência importantes estão representados nesta figura. Fonte: Traduzido de Polke, Hube e Jacobsen (2015).

O estado fisiológico em que as células fúngicas se encontram, quando em associação na forma de biofilme, desempenha papel fundamental na sobrevivência e modulação da resistência aos antifúngicos. Por exemplo, as células que se encontram nas camadas mais

basais do biofilme, chamadas de células persistentes ou latentes, são capazes de sobreviver em baixas concentrações de O<sub>2</sub>, permanecendo em um estado de dormência, ao passo que as células presentes nas demais camadas do biofilme, mostram-se metabolicamente mais ativas e expressam diferentes genes que conferem resistência ao estresse oxidativo. Por exemplo, regulam positivamente a glicólise, aumentam o metabolismo de ácidos graxos e síntese de ergosterol. Ademais, o aumento da densidade celular também contribui para uma diminuição da sensibilidade aos antifúngicos pelo biofilme, quando comparado às células planctônicas. Ainda, condições de estresse no ambiente que circunda o biofilme – concentração de oxigênio, temperatura, pH, concentração de glicose e íons como ferro – são capazes de alterar a estrutura do biofilme e a sensibilidade aos antifúngicos (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; RAMAGE et al., 2012).

Levando em consideração a importância do ergosterol como um dos alvos principais dos antifúngicos de uso clínico humano (azólicos e poliênicos), alterações nesse sítio-alvo acarretam aumento na resistência aos antifúngicos, principalmente aos azólicos. Esses antifúngicos possuem como mecanismo de ação a inibição da enzima 14  $\alpha$ -demetilase, codificada pelo gene *ERG11*, que tem por função converter o precursor lanosterol em ergosterol, um esterol de membrana que proporciona estruturação à célula fúngica. Uma vez inibida a enzima, ocorre o acúmulo de esteróis tóxicos dentro da célula e depleção do ergosterol, que inibe o crescimento do fungo. Assim, a super-expressão ou mutação do gene *ERG11* culmina na alteração do ergosterol da membrana resultando no aumento da resistência de biofilmes fúngicos aos azólicos e poliênicos (PARKER et al., 2014; XIE et al., 2014).

No tocante aos mecanismos de resistência mediados por bombas de efluxo, sabe-se que, em *C. albicans* esse fenômeno ocorre basicamente por dois mecanismos principais: bombas do tipo ABC (*ATP-binding cassette*), codificadas pelos genes *CDR1*, *CDR2*, *CDR3* e *CDR4*, sendo os dois primeiros, quando super-expressos, os principais responsáveis pela resistência a diversos azólicos; e as bombas do tipo MFS (*major facilitators superfamily*), codificadas pelo gene *MDR1*, as quais conferem resistência ao fluconazol. Bombas de efluxo são proteínas de membrana que atuam ativamente transportando substâncias pela membrana para fora da célula. Um aumento da expressão dos genes *CDR1*, *CDR2* e *MDR1* acarreta a diminuição da concentração dos azólicos no interior celular, implicando no aumento da resistência a esses antifúngicos (RAMAGE et al., 2012; KANAFANI; PERFECT, 2008).



### 2.3 INFECÇÕES POR *Candida*: PRINCIPAIS FORMAS CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E TRATAMENTO

A maioria das infecções causadas por *Candida* são originadas de maneira endógena, decorrentes da proliferação ou da mudança de sítio da levedura induzidos por algum fator de risco. Os principais fatores de risco para o surgimento de infecções por *Candida* são: imunidade severamente comprometida (por exemplo, neutropenia), pacientes com câncer que fazem uso de radioterapia ou quimioterapia (por exemplo, leucemia), interrupção das barreiras naturais de proteção (por exemplo, trauma, queimadura e cirurgia abdominal), diabetes, insuficiência renal aguda (por exemplo, processo de hemodiálise), pacientes transplantados (por exemplo, de medula óssea ou órgãos sólidos), uso de esteroides, nutrição parenteral, permanência prolongada em UTI, pacientes portadores do HIV e, sobretudo antibioticoterapia prolongada. Entretanto, também existe a possibilidade de infecções exógenas ocorrerem, a exemplo das infecções nosocomiais, nas quais a levedura pode ser veiculada pelas mãos dos profissionais de saúde, aparelhos de ventilação assistida, cateteres e outros dispositivos médicos implantáveis (PERLROTH; CHOI; SPELLBERG, 2007).

Clinicamente, as infecções causadas por espécies de *Candida*, se classificam de duas formas distintas: candidíase superficial (ou cutâneo-mucosa) e candidíase profunda (ou sistêmica) (JAYATILAKE; SAMARANAYAKE, 2010). De maneira genérica, infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida* são conhecidas como candidíase ou candidose (PFALLER et al., 2007). As candidíases podem evoluir de forma aguda, subaguda ou crônica, sempre apresentando caráter oportunista. Inflamação, produção de exsudatos e resposta granulomatosa, são os processos patológicos mais recorrentes. Quanto aos sítios de infecção, mucosas orofaríngeas e sistema genital são os mais acometidos em pacientes que apresentam candidíase (PAPPAS et al., 2006).

A candidíase superficial é considerada a mais comum entre as infecções causadas por espécies do gênero *Candida*, geralmente causada por *C. albicans*, pois é a espécie mais comum encontrada na microbiota de indivíduos clinicamente saudáveis (WATAMOTO et al., 2011). No entanto, outras espécies de *Candida* não-*C. albicans* têm emergido como importantes patógenos, como é o caso do Complexo *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr* e *C. guilliermondii*, sobretudo em contexto hospitalar. A candidíase orofaríngea, ocorre devido a um colapso na imunidade local do paciente, em consequência de traumatismo e atrofia epitelial, apresentando, geralmente,

placas esbranquiçadas, eritematosas e sensíveis à dor (JAYATILAKE; SAMARANAYAKE, 2010). A candidíase genital, principalmente em mulheres, também é considerada uma infecção bastante comum. Já na pele, a infecção manifesta-se nas dobras do corpo, incluindo os espaços interdigitais das mãos e dos pés. Enquanto nas unhas, apresenta erosão e espessamento da borda ungueal estendendo-se transversalmente pela lâmina, tornando-se distrófica e enegrecida (JAYATILAKE; TILAKARATNE; PANAGODA, 2009). A candidíase profunda ou sistêmica ocorre geralmente em pacientes que apresentam imunidade comprometida, podendo as leveduras se disseminarem no hospedeiro por meio da corrente sanguínea e atingir órgãos vitais como cérebro, coração e rins e está relacionada com altas taxas de mortalidade nesses indivíduos (JAYATILAKE; SAMARANAYAKE, 2010). A presença de *Candida* na corrente sanguínea denomina-se candidemia. Candidíase profunda é responsável por cerca de 2 a 14 casos por 100.000 habitantes nos Estados Unidos da América (PAPPAS et al., 2018). Ao passo que, no Brasil, a candidíase profunda corresponde a 2,49 casos por 1.000 admissões hospitalares, o que significa uma incidência de 3 a 10 vezes maior do que a relatada naquele país do Hemisfério Norte. A taxa de mortalidade decorrente dos casos de candidíase profunda é alta, variando de 5 a 70% (MELLO et al., 2017; RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008).

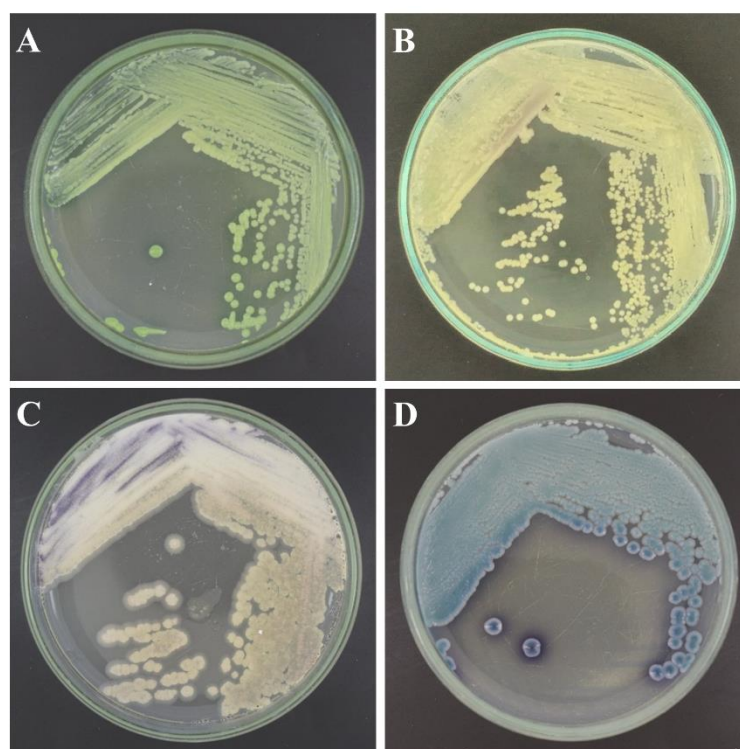
A identificação laboratorial das leveduras baseia-se em diversos testes que avaliam os aspectos macroscópicos e microscópicos da cultura *in vitro*, bem como as características fisiológicas e bioquímicas das células. Em meios de cultura convencionais em rotina micológica, como ágar batata dextrose, ágar Sabouraud e Mycosel, as colônias de *Candida* apresentam-se de maneira variada, com aspecto brilhoso ou opaco, textura lisa ou levemente rugosa, e coloração que pode variar de branco a creme. Os achados macroscópicos auxiliam no diagnóstico, porém, são inconclusivos ao serem analisados isoladamente. Dessa maneira, exames adicionais são empregados corriqueiramente na rotina laboratorial, a fim de aprimorar o diagnóstico, a saber: microscopia, produção do tubo germinativo e clamideoconídeo, microcultivo, assimilação de fontes de carboidratos e nitrogênio e fermentação de carboidratos. Essas provas são conhecidas como métodos fenotípicos tradicionais, considerados padrão-ouro para essa finalidade (MIMICA et al., 2009).

Microscopicamente, as formas assexuadas de *Candida* apresentam-se como células arredondadas ou elipsóides, podendo formar hifas ou pseudo-hifas. No crescimento em ágar malte por até três dias, a microscopia direta de *C. albicans* revela blascoconídeos arredondados ou ovais curtos; *C. parapsilosis* com blastoconídeos redondos, ovais ou

alongados, geralmente maiores que de *C. albicans*; *C. krusei* com muitos blastoconídeos alongados e; *C. tropicalis* com a maioria dos blastoconídeos redondos ou ovais curtos. Algumas estruturas celulares são produzidas apenas por determinadas espécies, como a formação de tubo germinativo por *C. albicans* e *C. dubliniensis*. O teste de formação do tubo germinativo é considerado um teste rápido e de fácil execução. Baseia-se na inoculação da levedura em um tubo de ensaio contendo soro bovino. Em seguida, o tudo é incubado a 37 °C por até 3 horas, tendo como resultado, o início da filamentação por essas espécies (BARNETT, 2004).

O microcultivo é uma técnica que proporciona baixas concentrações de O<sub>2</sub>, culminando em *stress* para *Candida*, favorecendo a filamentação. As células de *C. albicans* apresentam-se como pseudo-hifas, hifas e muitos blastoconídeos arredondados, com presença de clamideoconídeos, que são células assexuadas características de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, consideradas estruturas celulares de resistência. *C. parapsilosis* apresenta muitas pseudo-hifas com blastoconídeos emergindo dessas estruturas. *C. krusei* também mostra-se com acentuado número de pseudo-hifas alongadas. Assim como *C. tropicalis* demonstra numerosas pseudo-hifas com blastoconídeos, isolados em pequenos grupos ao longo de toda estrutura (BARNETT, 2004).

Em testes bioquímicos, como assimilação de fontes de carboidratos e nitrogênio e fermentação de carboidratos, *Candida* é capaz de utilizar, por via aeróbica ou anaeróbica, diversas fontes de açúcares, tais como glicose, galactose, sacarose, maltose, trealose e outras. Porém, por vezes ainda se fazem necessários testes adicionais para classificar o gênero *Candida* a nível de espécie. Assim, na década de 90, surgiram meios de cultura diferenciais cromogênicos, como o CHROMagar™ *Candida*, que auxiliam na triagem de leveduras de importância médica, diferenciando as colônias conforme a cor produzida e facilitando a detecção de culturas mistas (Figura 4) (MIMICA et al., 2009). *C. albicans*, por exemplo, apresenta colônias esverdeadas, *C. parapsilosis* podendo variar entre rosa-amarelado, *C. krusei* com coloração roxa/lilás e *C. tropicalis* com coloração azul. Métodos automatizados e semiautomatizados, como Vitek2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) também estão presentes no mercado a fim de agilizar o processo de identificação das leveduras. O princípio de identificação pelo Vitek2 se baseia nas características que *Candida* apresenta decorrente do crescimento em cartões de identificação que possui diversas provas bioquímicas (MIMICA et al., 2009).



**Figura 4:** Características morfológicas das colônias de *Candida* spp. em meio de cultura cromogênico CHROMagar™ *Candida*. (A) *C. albicans* ATCC 10231; (B) *C. parapsilosis* ATCC 22019; (C) *C. krusei* ATCC 6258 (D) *C. tropicalis* CEMM 03-6-070. Fonte: o autor (2018).

O desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular, que utilizam o DNA de agentes infecciosos, têm-se mostrado uma estratégia tecnicamente viável em grandes centros. A reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *polymerase chain reaction*) é a técnica mais adotada para esta finalidade, pois permite uma rápida identificação de diversos patógenos fúngicos. Para fins epidemiológicos, esta técnica fornece bons resultados e assim, é o método mais empregado para esse propósito devido à facilidade de execução. Também, é muito utilizada para comparar isolados obtidos de amostras clínicas daquelas obtidas de fontes inanimadas, o que auxilia a análise de inquéritos epidemiológicos de surtos hospitalares (MIMICA et al., 2009).

Quanto ao tratamento das infecções causadas por *Candida*, sobretudo das formas mais graves, as opções de fármacos são limitadas devido a diversos fatores, que incluem: similaridade bioquímica e fisiológica entre as células humanas e fúngicas; pequena quantidade de antifúngicos licenciados; utilização de drogas antigas em contexto clínico; uso de drogas com baixa eficácia; terapia de longo prazo; toxicidade intrínseca da maioria dos antifúngicos; numerosos e severos efeitos colaterais e; emergência de cepas de *Candida* resistentes aos antifúngicos (MELLO et al., 2017). Assim, os antifúngicos mais comumente

utilizados são os derivados poliênicos (anfotericina B), os derivados triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol) e as equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina) (MATTHAIYOU; CHRISTODOULOPOULOU; DIMOPOULOS, 2015).

A maioria dos antifúngicos de uso terapêutico, a exemplo da anfotericina B e dos azólicos, tem como alvo o ergosterol, um esterol da membrana fúngica muito semelhante ao colesterol presente na célula humana (ODDS; BROWN; GOW, 2003). Os antifúngicos utilizados atualmente dividem-se de acordo com o sítio de ação na célula fúngica: os que promovem alteração da permeabilidade da membrana celular por ligação ao ergosterol (derivados poliênicos); inibidores da síntese de ergosterol (azólicos) e; os inibidores da síntese da parede celular (equinocandinas) (KATHIRAVAN et al., 2012).

Os azólicos são drogas que exibem como mecanismo de ação a inibição da produção de ergosterol, um esterol importante para a membrana celular fúngica, atuando especificamente contra a enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase do complexo enzimático citocromo P450, na via da biossíntese do ergosterol (KATHIRAVAN et al., 2012). Terapia sistêmica com fluconazol oral ou itraconazol geralmente é eficiente para o tratamento de candidíase orofaríngea, entretanto existem relatos de surgimento de espécies de *Candida* resistentes *in vivo* e *in vitro* a esses fármacos (PAPPAS et al., 2018; 2006).

Estudos com espécies de *Candida* relacionadas a infecções humanas retratam um aumento na resistência desses micro-organismos aos derivados azólicos, sendo essa resistência relacionada principalmente ao fluconazol (PAPPAS et al., 2018; 2006). Esse azólico é o mais prescrito a nível mundial, sobretudo pelo baixo custo. É indicado, tanto para candidíase profunda, quanto para a maioria das infecções causadas por espécies de *Candida*, exceto para as infecções causadas por *C. krusei* que é intrinsecamente resistente a esse antifúngico. O fluconazol é o antifúngico mais utilizado, tanto na prevenção, quanto no tratamento para combater a candidemia (SANTOS-JÚNIOR et al., 2005), o que pode estar relacionado ao aumento na resistência a esse fármaco. A pressão seletiva causada pelo uso em demasia, quer seja de maneira profilática ou empírica, aliada a ampla variedade de espécies que respondem de maneiras diversas aos antifúngicos, pode ser considerado o principal motivo pelo qual venha ocorrendo aumento da resistência a esse fármaco (SANTOS-JÚNIOR et al., 2005).

Uma possível explicação para a resistência aos azólicos, pode ser explicada pelos seguintes motivos: mutação da enzima alvo do antifúngico e alteração do alvo (lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase); mutação do gene que codifica esta enzima; superprodução do alvo; efluxo

extracelular pela superprodução de bombas de efluxo e; alteração em outras etapas durante a biossíntese do ergosterol (SANTOS-JÚNIOR et al., 2005). Pode-se elencar como falhas na terapêutica antifúngica as doses inadequadas, absorção, distribuição ou metabolismo deficiente, interações medicamentosas, neutropenia grave, presença de corpo estranho e emergência da resistência aos antifúngicos (SANTOS-JÚNIOR et al., 2005).

#### 2.4 EFEITO DE ANTIBACTERIANOS SOBRE *Candida* E NA INTERAÇÃO COM A MICROBIOTA

Os principais antibacterianos de amplo espectro utilizados no tratamento de infecções sistêmicas em ambiente hospitalar são os  $\beta$ -lactâmicos e o glicopeptídeo vancomicina (GUSTINETTI; MIKULSKA, 2016). Os antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos constituem um grupo de fármacos que compartilham a estrutura comum do anel  $\beta$ -lactâmico em sua composição e tem como mecanismo de ação a interferência na síntese da parede celular bacteriana. Esse grupo é subclassificado em penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e inibidores de  $\beta$ -lactamases. Em bactérias, o principal constituinte estrutural celular é uma camada de peptidoglicano. Os antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos se ligam a enzimas específicas que sintetizam a camada de peptidoglicano, as chamadas proteínas ligantes de penicilina (PBP, do inglês, *penicillin-binding proteins*), impedindo a formação da parede, atuando como agentes bactericidas. Já o glicopeptídeo vancomicina, atua se ligando na porção terminal D-alanina-D-alanina das cadeias laterais das moléculas de peptidoglicano, impedindo a formação de pontes de ligação entre as moléculas e conseqüentemente, inibindo a síntese da parede celular (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

O antibacteriano  $\beta$ -lactâmico amoxicilina é muito usado na prática médica, sobretudo por apresentar toxicidade extremamente baixa. A amoxicilina é uma penicilina bioquimicamente modificada, produzida a partir da cultura do fungo *Penicillium chrysogenum*. É considerada um antibacteriano de amplo espectro por possuir atividade antibacteriana contra cocos Gram-positivos, tais como estreptococos  $\beta$ -hemolíticos e a maioria das outras espécies, meningococos e a maioria dos anaeróbios Gram-positivos e, contra alguns bacilos Gram-negativos, tais como *Escherichia coli*, *Proteus* e algumas espécies de *Haemophilus* (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

As cefalosporinas são antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos originalmente produzidos pelo gênero fúngico *Cephalosporium* e possuem o mesmo mecanismo de ação das penicilinas,

porém, com espectro mais amplo, sobretudo contra Gram-negativas e melhores propriedades farmacocinéticas, como o tempo de meia-vida mais longo. Baseado em modificações bioquímicas na molécula base das cefalosporinas, elas são classificadas em diferentes gerações, resultando em espectros de ação diversos. As cefalosporinas de 1ª geração, possuem espectro restrito de ação, limitado-se a *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus mirabilis* e alguns cocos Gram-positivos sensíveis à penicilina oxacilina. As cefalosporinas de 2ª geração apresentam espectro de ação expandido, pois além de atuar contra as bactérias sensíveis às cefalosporinas de 1ª geração, demonstra ação inibitória sobre *H. influenzae*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* spp., e alguns anaeróbios, como *Bacterioides fragilis*. Já as cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, possuem amplo espectro e espectro estendido de ação, respectivamente, pois possuem atividade inibitória adicional contra a maioria das Enterobacteriaceae e *Pseudomonas aeruginosa*. As cefalosporinas de 4ª geração, são muito prescritas na rotina médica, como é o caso de cefepime, pois oferece a vantagem de apresentar maior estabilidade contra as enzimas que degradam os antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos, as  $\beta$ -lactamases (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

Os antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos carbapenêmicos possuem o mesmo mecanismo de ação das penicilinas e cefalosporinas e, são amplamente prescritos por serem ativos contra muitos grupos de bactérias. No entanto, como desvantagem, pelo fato de possuírem amplo espectro de ação, podem alterar a população bacteriana normal, acarretando em sérios riscos para o paciente. Os carbapenêmicos, como imipenem e meropenem, são ativos contra a maioria dos Gram-positivos aeróbios e anaeróbios e, bactérias Gram-negativas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

O glicopeptídeo vancomicina é um antibacteriano originalmente produzido por *Streptomyces orientalis* e, também impede a formação da parede de peptidoglicano, assim como os  $\beta$ -lactâmicos, porém, por outro mecanismo de ação já descrito. A vancomicina possui um espectro de ação restrito a bactérias Gram-positivas, pois a estrutura química da molécula é muito grande para atravessar os poros da membrana externa das bactérias Gram-negativas e atingir o peptidoglicano. Contudo, a vancomicina é um antibacteriano muito importante em rotina médica, uma vez que é amplamente utilizada no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* resistente a oxacilina e outros cocos Gram-positivos resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

Já é bem claro que a utilização de antibacterianos de amplo espectro é capaz de alterar a composição da microbiota do hospedeiro, sobretudo a de mucosas, favorecendo a

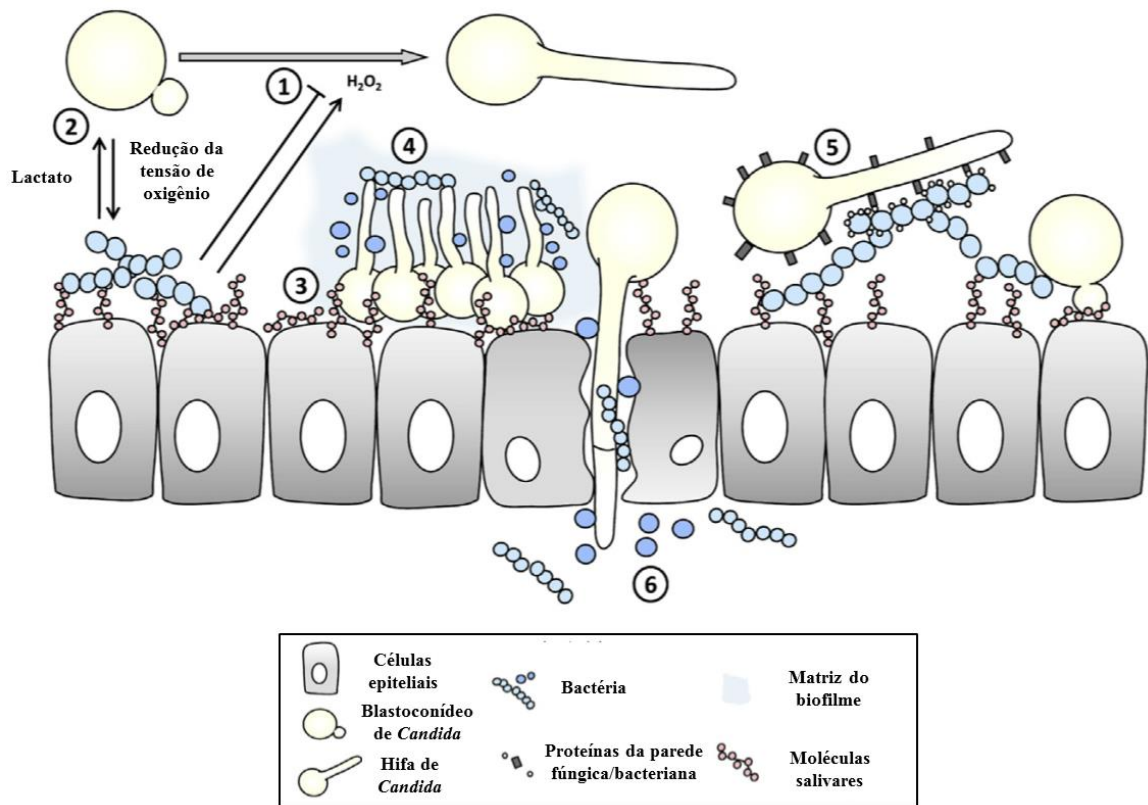
colonização desses locais por *Candida* (SAMONIS et al., 2006; 2008; 2013). Porém, pouco se sabe sobre o efeito dos antibacterianos de amplo espectro em face de *Candida*, sobretudo quanto ao metabolismo celular, virulência e resistência aos antifúngicos. Esse gênero é um dos principais constituintes da microbiota de humanos e animais, encontrado sobretudo como micro-organismo comensal nas mucosas, tais como cavidade oral e trato gastrointestinal. Dessa maneira, *Candida* está presente em nichos no hospedeiro que são cocolonizados por uma grande variedade de outros micro-organismos. Assim, interações entre *Candida* e bactérias da microbiota têm evoluído durante a coexistência no hospedeiro humano. Essas interações podem ser harmônicas ou desarmônicas e, podem ocorrer de diversas formas, a saber: pelo contato direto entre as células; pela secreção de moléculas de sinalização ou toxinas; competição por nutrientes/metabólitos; ou simplesmente a partir da alteração do ambiente, como por exemplo, pelo uso de antibacterianos de amplo espectro. Além disso, co-infecções são bastante comuns, pois cerca de 4,8% de todos os casos de candidemias envolvem mais de uma espécie de *Candida* e, estima-se que mais de 20% dos casos de candidemia por *C. albicans* também envolvam bactérias (COSTA-ORLANDI et al., 2017).

Experimentos em modelos murinos têm demonstrado que a microbiota bacteriana pode interferir no processo de colonização por *Candida* uma vez que ocorre competição por nutrientes e pela produção de substâncias tóxicas, as quais interferem na adesão das leveduras às células epiteliais do hospedeiro. Porém, já foi descrito na literatura que interações entre fungos e bactérias podem ser benéficas para *C. albicans*. Neste contexto, pode a levedura reagir diretamente com as moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular bacteriana, que é um importante modulador da virulência de *C. albicans* contribuindo para a coinfeção por *C. albicans* e *E. coli*. Nesta perspectiva, a infecção no trato urinário por *E. coli* aumenta a adesão à mucosa da bexiga por *C. albicans*, permitindo que as células fúngicas colonizem e se proliferem neste ambiente, causando infecção subsequente. Ademais, *C. albicans* também reconhece moléculas de muramyl dipeptídeos (MDPs), que são subunidades de peptidoglicano que estimulam a diferenciação de levedura para hifa, que é intimamente relacionada com a virulência de *C. albicans*. É bastante comum encontrar *C. albicans* em contato com massas de MDPs da microbiota normal em certos nichos, como por exemplo, no trato gastrointestinal. Em condições saudáveis, a filamentação é inibida provavelmente por mecanismos adicionais. Em contrapartida, o uso de antibacterianos de amplo espectro, como os  $\beta$ -lactâmicos, eliminam a microbiota bacteriana, levando a um aumento de MDPs,



acarretando em falha no controle do crescimento fúngico e da filamentação, aumentando assim o risco de infecção sistêmica por *Candida* (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).

Outro exemplo de interações mutualísticas entre *C. albicans* e bactérias são os casos de biofilmes multiespécies, sobretudo nas infecções orais (Figura 5). A maioria das infecções orais são polimicrobianas, uma vez que a cavidade bucal abriga uma ampla variedade de bactérias comensais e patógenos oportunistas, como *C. albicans*. Neste cenário, os estreptococos são componentes principais do microbioma oral e *C. albicans* formam agregados com diferentes espécies de *Streptococcus* orais, tais como *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. mutans*. Por exemplo, *S. gordonii* reconhecem adesinas de *C. albicans*, tais como Als3, Eap1 e Hwp1, e se liga às células fúngicas, formando microcolônias de *S. gordonii* sobre células de *C. albicans* aderidas na mucosa oral. Além disso, *S. gordonii* produz glucanos solúveis que estimulam a produção de matriz por *C. albicans*. Adicionalmente, *S. gordonii* sintetiza substâncias autoindutoras, como AI-2, que induz baixos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que além de inibir o crescimento de outras bactérias competitivas, estimula a filamentação de *C. albicans*. Por sua vez, a filamentação de *C. albicans* fornece sítios de adesão para *S. gordonii*, promove danos na mucosa oral, liberando nutrientes para o crescimento bacteriano, abrindo o caminho para a infecção disseminada por ambas as espécies (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).



**Figura 5:** Interações entre *Candida* e bactérias. (1) Indução ou inibição da filamentação de *Candida* é um fenômeno espécie-dependente, por exemplo, a produção de  $H_2O_2$  por *Streptococcus* promove o crescimento de hifas de *C. albicans*; (2) o lactato secretado pela bactéria é usado por *C. albicans* como fonte de carbono alternativa, ao passo que a redução da tensão de oxigênio local por *C. albicans* propicia o crescimento bacteriano; (3) a adesão de *C. albicans* às moléculas salivares proporciona um nicho de colonização; (4) a adesão das células bacterianas às hifas de *C. albicans* resulta na produção de biofilmes multiespécies; (5) a adesão de *C. albicans* aos suportes de bactérias pré-aderidas, favorece a colonização fúngica; (6) o dano tecidual causado por *C. albicans* promove a invasão e disseminação de ambas as espécies. Fonte: Traduzido de Polke, Hube e Jacobsen (2015).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito de antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e vancomicina sobre o crescimento e virulência de *Candida* spp. e diante do biofilme de *C. albicans*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a ação de antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e vancomicina sobre o crescimento planctônico de *Candida* spp.;
2. Investigar o efeito de antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e vancomicina em face da atividade enzimática relacionada à virulência de *Candida* spp.;
3. Averiguar o papel *in vivo* de antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e vancomicina diante *Candida* spp. em modelo de infecção experimental utilizando *Caenorhabditis elegans*;
4. Avaliar a influência de antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos em face da produção de biofilme por *C. albicans*;
5. Verificar a ação de extratos de biofilme de *Escherichia coli* tratados com os antibacterianos sobre o biofilme de *C. albicans*;
6. Determinar o efeito de antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos em face da composição da matriz exopolimérica do biofilme produzido por *C. albicans*; e
7. Estipular a ação de antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos em face da tolerância do biofilme de *C. albicans* a antifúngicos de uso clínico.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo investigou o efeito de antibacterianos no crescimento plânctônico, produção de fatores de virulência *in vitro* e virulência *in vivo* de *Candida* spp., bem como averiguou a ação desses fármacos sobre o biofilme de *C. albicans*. Com a finalidade de facilitar o entendimento dos procedimentos, o presente estudo foi dividido em duas etapas experimentais descritas nos itens 4.4 e 4.5.

### 4.1 LOCAIS DE ESTUDO

O presente estudo foi realizado no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), localizado no Centro de Biomedicina da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE. A aquisição das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi executada na Central Analítica da UFC. A análise dos componentes da matriz dos biofilmes foi realizada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) localizado na Cidade Universitária de Recife-PE aos cuidados do Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, professor do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

### 4.2 MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS

Foram utilizadas estirpes de referência de *Candida* spp. obtidas de isolados clínicos humanos e pertencentes à Coleção de Culturas do CEMM. A pesquisa foi conduzida com linhagens das seguintes espécies: *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 e *Escherichia coli* ATCC 25922. A cepa de *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 foi isolada de um paciente com fungemia e identificada por meio de crescimento em CHROMagar™ *Candida*, micromorfologia em ágar *corn meal* e características bioquímicas evidenciadas em sistema automatizado Vitek2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França). As cepas de *E. coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram utilizadas como controle de ação dos antibacterianos.

### 4.3 ANTIBACTERIANOS UTILIZADOS

Foram incluídos cinco antibacterianos comumente utilizados na terapêutica clínica de pacientes com neutropenia febril e principais infecções relacionadas em pacientes portadores de neoplasia hematológica. As informações para escolha dos fármacos foram obtidas a partir do Serviço de Hematologia e Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital Universitário Walter Cantídio da UFC, baseado em protocolos terapêuticos consensuais (GUSTINETTI; MIKULSKA, 2016). Foram utilizados os antibacterianos cefepime, imipenem, meropenem, amoxicilina e vancomicina (Tabela 1) com base nas concentrações de pico plasmático (PP) e duas vezes o pico plasmático (2xPP) de cada droga (GOODMAN; GILMAN, 2007). Também foram utilizados os antifúngicos anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC), itraconazol (ITC), voriconazol (VRC) e caspofungina (CAS). As soluções-mãe dos antibacterianos foram diluídas em água destilada estéril, conforme recomendado pelos fabricantes.

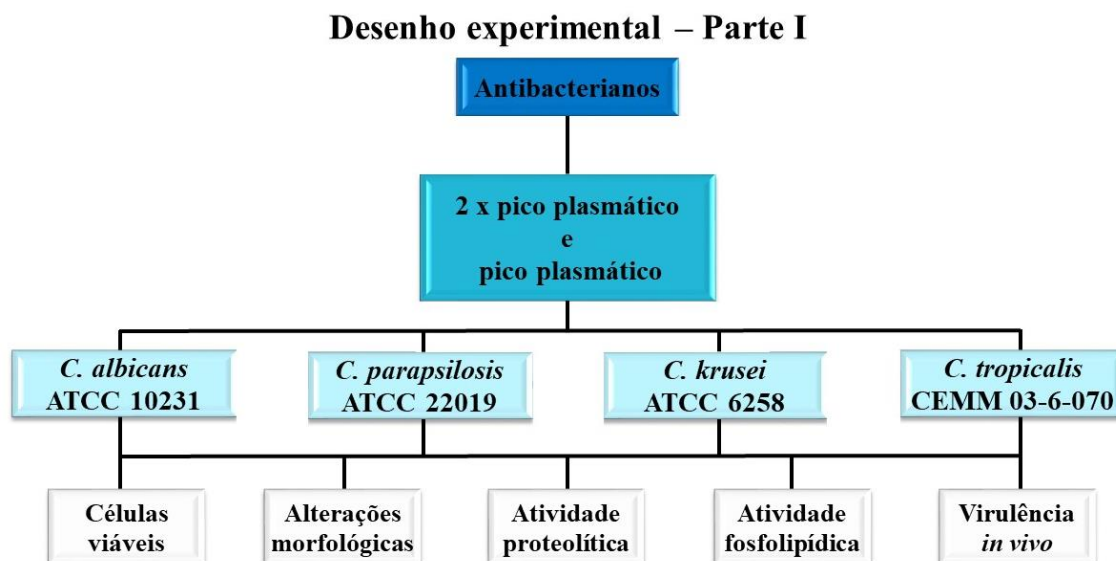
**Tabela 1:** Antibacterianos utilizados.

Antibacteriano	Pico plasmático*	2 vezes o pico plasmático	Fabricante
<b>Cefepime</b>	126 µg/mL	252 µg/mL	Novafarma, BR
<b>Imipenem</b>	33 µg/mL	66 µg/mL	AstraZeneca, BR
<b>Meropenem</b>	33 µg/mL	66 µg/mL	AstraZeneca, BR
<b>Amoxicilina</b>	4 µg/mL	8 µg/mL	Sigma-Aldrich, EUA
<b>Vancomicina</b>	15 µg/mL	30 µg/mL	Sigma-Aldrich, EUA

Legenda: BR = Brasil; EUA = Estados Unidos da América. \* Fonte: GOODMAN; GILMAN, 2007.

### 4.4 DESENHO EXPERIMENTAL – PARTE I

Nesta etapa experimental, investigou-se o efeito dos antibacterianos sobre o crescimento planctônico e virulência *in vitro* e *in vivo* de *Candida* spp. Investigou-se, também, a contagem de Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL), alterações morfológicas (citometria de fluxo), atividade enzimática (proteolítica e fosfolipídica) e virulência *in vivo* utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans* como modelo de infecção experimental (Figura 6).



**Figura 6:** Desenho experimental – Parte I.

#### 4.4.1 Efeito dos antibacterianos em face do crescimento planctônico de *Candida* spp.

Foi determinado o efeito dos antibacterianos cefepime, imipenem, meropenem, amoxicilina e vancomicina nas concentrações de 2xPP e PP, de cada antibacteriano, sobre o crescimento planctônico de *Candida* spp. Utilizou-se as seguintes estirpes: *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. tropicalis* CEMM 03-6-070. O experimento foi realizado em modelo do tipo microdiluição em caldo, segundo protocolo M27-A3 definido pelo CLSI (2008). Os inóculos foram preparados em meio RPMI-1640 com concentração celular final de aproximadamente  $0,5 - 2,5 \times 10^3$  células/mL. Após 48 h de crescimento a 37 °C, o cultivo foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta estéril e, uma alíquota de 100 µL foi diluída em solução salina estéril na proporção de 1:10 e, utilizada para contagem de UFC/mL por meio de subcultivos em ágar batata (CORDEIRO et al., 2017). Foram utilizadas como controle de ação dos antibacterianos as cepas de *E. coli* ATCC 25922 (controle dos antibacterianos β-lactâmicos) e *S. aureus* ATCC 25923 (controle da vancomicina) de acordo com o manual M07-A9 (CLSI, 2012). Para tanto, foram preparados inóculos bacterianos correspondentes à escala 0,5 de McFarland (aproximadamente  $1 - 2 \times 10^8$  células/mL) e o teste realizado em sistema do tipo microdiluição em caldo, usando o meio de cultura Mueller-Hinton. Os *breakpoints* foram definidos pela concentração inibitória mínima (CIM) capaz de inibir 100% o crescimento visual das bactérias. O tempo de leitura foi de 20 h para os antibacterianos β-lactâmicos e 24 h para a vancomicina, de acordo com o protocolo M100-S24 do CLSI (2014) (Apêndice A). Os testes foram realizados em triplicata.

#### **4.4.2 Efeito dos antibacterianos em face do volume e complexidade celular de *Candida* spp. em crescimento planctônico**

O efeito dos antibacterianos cefepime, imipenem, meropenem, amoxicilina e vancomicina em face do volume e complexidade celular de células planctônicas de *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 foi analisado por citometria de fluxo baseado em Andrade-Neto et al., (2014), com modificações. Para tanto, inóculos das cepas de *Candida* spp. foram preparados como descrito anteriormente (item 4.4.1) para os testes de sensibilidade e as células foram incubadas em meio RPMI-1640 contendo cada antibacteriano teste e incubadas durante 48 h a 37 °C. As células foram experimentadas em face da concentração de 2xPP e PP de cada droga. Decorrido o período de incubação, o cultivo foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta estéril e, uma alíquota de 100 µL foi diluída 1:10 em solução de PBS estéril. Em seguida, a suspensão celular foi avaliada em citômetro de fluxo Epics XL FACScan (Beckman Coulter, Califórnia, EUA) utilizando-se 10.000 células para contagem.

#### **4.4.3 Efeito dos antibacterianos em face da atividade proteolítica de *Candida* spp.**

A detecção da atividade proteolítica foi realizada conforme Cordeiro et al., (2015a), a partir de modificações do protocolo original de Charney e Tomarelli (1947). As células de *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 foram cultivadas conforme previamente descrito (item 4.4.1) na presença de cefepime, imipenem, meropenem, amoxicilina e vancomicina nas concentrações de 2xPP e PP de cada droga. Nos intervalos de 6, 24 e 48 h, alíquota de 200 µL de cada sobrenadante foi coletada e adicionado a 200 µL de uma solução de azoalbumina (0,3% diluída em uma solução de bicarbonato de sódio a 1%, pH 8,3) e, em seguida, o volume final de 400 µL foi incubado em banho-maria a 37 °C por 3 h. Decorrido esse tempo, a reação enzimática foi parada com a adição de 1.600 µL de ácido tricloroacético a 5%. A solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos e 1 mL do sobrenadante foi retirado e adicionado a 1 mL de uma solução de NaOH a 0,5 mol/L. Após agitação em vórtex por 30 segundos, a solução foi lida em espectrofotômetro a 440 nm. O branco da leitura do experimento foi preparado sem a inoculação dos micro-organismos e o controle positivo do teste foi feito na presença dos micro-organismos e ausência das drogas. Os testes foram realizados em triplicata.

#### 4.4.4 Efeito dos antibacterianos em face da atividade fosfolipídica de *Candida* spp.

A atividade fosfolipídica de *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 em face dos antibacterianos cefepime, imipenem, meropenem, amoxicilina e vancomicina, foi avaliada conforme descrito por Cordeiro et al., (2015b). Utilizou-se o meio de cultura ágar gema de ovo, contendo ágar Sabouraud dextrose 2% adicionado de 1 mol/L de cloreto de sódio, 0,05 mol/L de cloreto de cálcio e 8% de uma emulsão de gema de ovo estéril a 30%. O meio foi distribuído em placas de Petri estéreis de 90-mm. As leveduras foram previamente crescidas em RPMI-1640, contendo as concentrações de 2xPP e PP de cada antibacteriano testado, por 48 h a 37 °C. Após esse período, foi preparado um inóculo fúngico correspondente à escala 4 de McFarland. Em seguida, 5 µL de cada inóculo foram pipetados em discos de papel filtro esterilizados de aproximadamente 5 mm, os quais foram depositados nas placas contendo o meio ágar gema de ovo. Por fim, as placas foram incubadas a 35 °C por 7 dias. Decorrido o período de incubação, foi mensurado o diâmetro total dos halos de precipitação com as colônias utilizando um paquímetro. Os testes foram realizados em duplicata.

#### 4.4.5 Efeito dos antibacterianos em face da virulência *in vivo* de *Candida* spp.

O efeito dos antibacterianos cefepime, imipenem, meropenem, amoxicilina e vancomicina em face da virulência *in vivo* de *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 foi investigado em modelo de infecção experimental utilizando *Caenorhabditis elegans* conforme metodologia descrita por Cordeiro et al., (2015a), a partir de adaptações do protocolo original de Breger et al., (2007). Nematódeos em estágio L4 foram previamente cultivados em meio NGM (*Nematode Growth Medium*) com *Escherichia coli* OP50. As cepas de *Candida* spp. foram previamente expostas às concentrações de 2xPP e PP de cada droga durante 48 h, conforme descrito anteriormente (item 4.4.1). Decorrido esse tempo, os vermes foram transferidos do meio NGM, após lavagem com tampão M9 (3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5g NaCl e 1g NH<sub>4</sub>Cl), para as placas contendo os micro-organismos em contato com a droga. Em seguida, as placas foram mantidas em temperatura de 25 °C por 3 h para que os nematódeos se alimentassem dos micro-organismos. Decorrido esse período, os nematódeos foram submetidos a três lavagens consecutivas em caldo BHI para retirada dos micro-organismos



aderidos à cutícula. Passado esse processo, aproximadamente 50 vermes/poço foram transferidos para placas de microtitulação de seis poços contendo 1,5 mL de meio líquido composto por 79% v/v de tampão M9, 20% v/v de BHI, 10 µg/mL de colesterol diluído em etanol. Os antibacterianos foram adicionados novamente na concentração de 2xPP e PP. As placas foram incubadas por cinco dias a 25 °C, sendo feita análise da viabilidade dos nematódeos, utilizando um estereomicroscópio, nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 h. Foram considerados mortos os animais que apresentavam estruturas fúngicas exteriorizando-se do pseudoceloma do nematódeo e/ou que não respondessem a estímulos mecânicos. Cada verme considerado morto era retirado do poço da placa ao longo do experimento, sendo estabelecida uma curva de sobrevivência ao final do teste (BREGGER et al., 2007). Foi realizado o controle de toxicidade dos antibacterianos utilizando as concentrações de 2xPP e PP de cada droga diante *C. elegans* livre de *Candida* spp. e, também, o controle com a cepa de *E. coli* OP50 sem antibacteriano (Apêndice B).

#### 4.5 DESENHO EXPERIMENTAL – PARTE II

Nesta etapa experimental, avaliou-se o efeito dos antibacterianos e de extratos de biofilme de *Escherichia coli* ATCC 25922 tratados com os antibacterianos sobre o biofilme de *C. albicans* ATCC 10231. Analisou-se a produção de biomassa (cristal violeta), atividade metabólica (XTT), células viáveis (UFC/mL), ultraestrutura do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV), biovolume e espessura (microscopia confocal), atividade proteolítica (azoalbumina como substrato), quantificação de carboidratos e proteínas (coloração com calcoflúor-white, vermelho do Congo, safranina e SYPRO<sup>®</sup> Ruby), composição química da matriz do biofilme analisada pela técnica de *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) e tolerância aos antifúngicos (AMB, FLC, ITC, VRC e CAS) (Figura 7).

Inicialmente, foi realizado um *screening* com todos os antibacterianos em face da produção de biomassa do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231. Baseado nos resultados da parte I, os quais não houve diferença entre as duas concentrações testadas de cada antibacteriano (2xPP e PP), apenas a concentração de PP foi utilizada nos testes da parte II do presente estudo. Aqueles antibacterianos que mais intensificaram a produção de biomassa dos biofilmes foram escolhidos para os demais testes. Todos os testes foram realizados em triplicata.

## Desenho experimental – Parte II

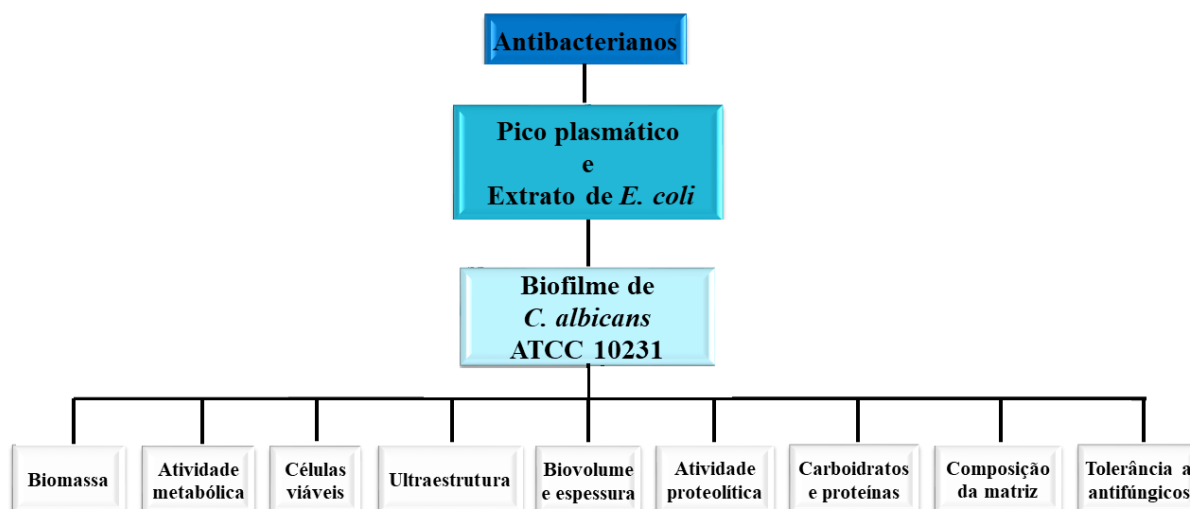


Figura 7: Desenho experimental – Parte II.

### 4.5.1 Efeito dos antibacterianos em face da biomassa do biofilme produzido por *Candida albicans*

Baseado no *screening* de produção de biomassa (Apêndice C), foram escolhidos os antibacterianos cefepime e amoxicilina para determinar o efeito dessas drogas em face da produção de biofilme por *C. albicans* ATCC 10231, conforme Cordeiro et al., (2015b). Com a finalidade de simular a ação desses antibacterianos sobre a interação de *C. albicans* com bactérias da microbiota humana, investigou-se o efeito de extratos filtrados de biofilmes de *E. coli* ATCC 25922 tratados com cefepime ou amoxicilina diante da produção de biofilme de *C. albicans* ATCC 10231. Para obtenção dos extratos, biofilmes de *E. coli* ATCC 25922 foram formados em placas de microtitulação de fundo chato de 96 poços com inóculo correspondente à escala 1 de McFarland em meio Mueller Hinton, com concentração celular final de aproximadamente  $3 \times 10^8$  células/mL (CRÉMET et al., 2013). Decorridas 24 h de incubação a 30 °C, o sobrenadante foi aspirado e cada poço foi lavado duas vezes com PBS estéril, em seguida foi adicionado novo meio de cultura Mueller Hinton contendo a concentração de PP de cada antibacteriano testado. Após 24 h, os poços das placas foram vigorosamente raspados com auxílio de pipetas estéreis e o material foi aspirado e centrifugado a 3.500 rpm por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm e esse material foi utilizado como substrato de crescimento para a formação de biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231 para os experimentos descritos a seguir.

Os biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231 foram formados em placas de microtitulação de fundo chato de 96 poços com inóculo inicial equivalente à escala 1 de McFarland (aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/mL) em meio RPMI-1640 contendo a concentração de PP de cada antibacteriano testado e os extratos filtrados dos biofilmes de *E. coli* ATCC 25922 tratados com os antibacterianos mencionados nas mesmas concentrações. As placas foram incubadas a 37 °C e nos intervalos de tempo de 6, 24 e 48 h foi realizada a quantificação de biomassa utilizando a técnica de coloração com cristal violeta (CORDEIRO et al. 2015b). Em cada tempo de análise o meio de cultura foi aspirado e cada poço foi lavado duas vezes com PBS estéril e em seguida os biofilmes foram fixados com metanol a 100% e o sobrenadante foi aspirado. Uma alíquota de 100 µL de cristal violeta a 0,3% diluído em água destilada foi adicionada a cada poço. Depois de 20 min a 25 °C, a solução de corante foi aspirada e os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de água destilada estéril. Finalmente, foram adicionados 150 µL de ácido acético a 33% aos poços corados e deixado durante 30 segundos. Após este período, o volume foi transferido para outra placa que foi imediatamente lida em espectrofotômetro a 590 nm (CORDEIRO et al., 2015b). Os testes foram realizados em triplicata.

#### **4.5.2 Efeito dos antibacterianos em face da atividade metabólica do biofilme produzido por *Candida albicans***

Para determinar o efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina e dos extratos filtrados dos biofilmes de *E. coli* ATCC 25922 tratados com os antibacterianos mencionados em face da atividade metabólica do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231, utilizou-se a técnica de redução do XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) como descrito por Bizerra et al., (2008), com modificações. Os biofilmes foram formados como descrito anteriormente (item 4.5.1) e os antibacterianos também foram testados na concentração de PP. Também foram utilizados os extratos dos biofilmes de *E. coli* ATCC 25922 tratados com os antibacterianos mencionados nas mesmas concentrações. Nos tempos de análise de 6, 24 e 48 h, o meio de cultura foi aspirado e cada poço foi lavado duas vezes com PBS estéril. Em seguida, uma alíquota de 125 µL de XTT/menadiona [0,1 mg/mL de XTT e menadiona 1 mM (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA)] foi adicionada a cada poço, e as placas foram incubadas ao abrigo da luz direta durante 3 h a

37 °C. Decorrido esse tempo, o conteúdo foi transferido para novas placas de microtitulação e realizada leitura espectrofotométrica a 490 nm. Os testes foram realizados em triplicata.

#### **4.5.3 Efeito dos antibacterianos em face da detecção de células viáveis do biofilme produzido por *Candida albicans***

Para avaliar o efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina testados na concentração de PP, e dos os extratos filtrados dos biofilmes de *E. coli* ATCC 25922 tratados com os antibacterianos mencionados na mesma concentração em face da viabilidade celular do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231, aplicou-se a técnica de contagem de UFC/mL conforme descrito em Cordeiro et al., (2017). Os biofilmes foram montados como descrito anteriormente (item 4.5.1). Nos intervalos de 6, 24 e 48 h de análise, os poços das placas foram raspados com auxílio de pipetas estéreis e uma alíquota de 100 µL foi coletada. Em seguida, foi feita diluições seriadas de 1:10 em solução salina estéril e a amostra foi semeada em ágar batata para posterior contagem de UFC/mL (CORDEIRO et al., 2017). Os testes foram realizados em triplicata.

#### **4.5.4 Efeito dos antibacterianos em face da morfologia e ultraestrutura do biofilme produzido por *Candida albicans***

O efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina, testados na concentração de PP e dos extratos dos biofilmes de *E. coli* ATCC 25922 tratados com os antibacterianos mencionados testados na mesma concentração sobre a morfologia e ultraestrutura do biofilme de *C. albicans* ATCC 10231 foi avaliada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de acordo com Cordeiro et al., (2017) e microscopia confocal segundo Kagan et al., (2014). Para ambas as análises, os biofilmes foram formados em lâminas de Thermanox<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific, Nova Iorque, EUA) com inóculo inicial equivalente à escala 1 de McFarland (aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/mL) em meio RPMI-1640.

Para a análise por MEV, após a incubação durante 48 h a 37 °C, os biofilmes foram fixados com glutaraldeído a 2,5% em tampão de cacodilato de sódio 0,15 M contendo azul de alcian (0,1%) e incubados *overnight* a 4 °C. Depois disso, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão de cacodilato 0,15 M, durante 5 min e submetidos à desidratação alcoólica crescente em etanol (50, 70, 80, 95, e 100% [duas vezes]; 10 min cada). Em seguida, foi

realizada secagem química durante 30 min com hexametildisilazano (Polysciences, Hirschberg an der Bergstrasse, Alemanha) e, finalmente, os biofilmes foram secos *overnight* em dessecador. As lâminas de Thermanox<sup>®</sup> foram recobertas com camada de 10 nm de ouro em metalizadora Emitech Q150T (Quorum Technologies, Lewes, Reino Unido), e observadas em microscópio eletrônico de varredura FEI Inspect S50 (FEI Company, Óregon, EUA), no modo de alto vácuo a 15 kV.

Para a análise por microscopia confocal, os biofilmes foram corados com o kit de viabilidade *Live/Dead*<sup>™</sup> (Invitrogen, Califórnia, EUA), compreendendo os corantes SYTO-9, que identifica a 488 nm células viáveis em verde, e iodeto de propídio, que identifica a 561 nm células inviáveis em vermelho. Para tanto, utilizou-se o microscópio confocal Nikon C2+ (Nikon, Tóquio, Japão) e, as imagens foram processadas e analisadas utilizando o *software* *ImageJ* 1.50i, mensurando-se o biovolume (área ocupada pelo biofilme) e a espessura (altura) dos biofilmes (COLLINS, 2007).

#### **4.5.5 Efeito dos antibacterianos em face da atividade proteolítica do biofilme produzido por *Candida albicans***

Para determinar o efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina e dos os extratos filtrados dos biofilmes de *E. coli* ATCC 25922 tratados com os antibacterianos mencionados em face da atividade proteolítica de biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231, adotou-se a metodologia descrita por Cordeiro et al., (2017), a partir de modificações do protocolo original de Charney e Tomarelli (1947). Os biofilmes foram montados conforme mencionado anteriormente (item 4.5.1). Os antibacterianos foram testados na concentração de PP bem como foram utilizados os sobrenadantes filtrados dos biofilmes de *E. coli* ATCC 25922 tratados com os antibacterianos citados. Nos tempos de análise de 6, 24 e 48 h uma alíquota de 200 µL de cada sobrenadante foi coletada e processada para detecção de atividade proteolítica conforme mencionado anteriormente (item 4.4.3).

#### **4.5.6 Efeito dos antibacterianos em face da quantificação de carboidratos e proteínas do biofilme de *Candida albicans***

Foi avaliada a ação dos antibacterianos cefepime e amoxicilina sobre a quantificação de carboidratos e proteínas do biofilme de *C. albicans* ATCC 10231. Para tanto, a quantificação de carboidratos foi realizada por coloração com calcoflúor-white (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) baseado em Clark et al., (2018), vermelho do Congo (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) conforme Bazzini et al., (2011) e safranina de acordo com Anne-Marie et al., (2014) com modificações. Ao passo que a quantificação de proteínas foi determinada pela coloração com SYPRO® Ruby (Thermo Fisher Scientific, Nova Iorque, EUA), conforme Mohammed et al., (2013), com adaptações. Após 48 h de formação do biofilme na presença de cefepime ou amoxicilina na concentração de PP, como descrito anteriormente (item 4.5.1), o sobrenadante foi aspirado e os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril. Em seguida, foram adicionadas aos poços as soluções de calcoflúor-white a 1%, vermelho do Congo a 0,1%, safranina a 0,1% e SYPRO® Ruby. Após 10 minutos no escuro, os poços foram lavados duas vezes com água Milli-Q estéril e as culturas foram ressuspensas em água Milli-Q estéril e embaladas ao abrigo da luz. Em seguida, as leituras de fluorescência de 430 nm / 510 nm e 465 nm / 630 nm, foram realizadas no equipamento Cytation 3 (BioTek, Vermont, EUA) para a coloração com calcoflúor-white e SYPRO® Ruby, respectivamente. Para os corantes vermelho do Congo e safranina, as soluções foram transferidas para novos poços e a leitura espectrofotométrica foi realizada a 490 nm e 630 nm, respectivamente. Os testes foram realizados em triplicata.

#### **4.5.7 Efeito dos antibacterianos em face da composição da matriz do biofilme produzido por *Candida albicans***

Foi determinado o efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina testados na concentração de PP em face da composição da matriz do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231. Para tanto, os biofilmes foram formados como descrito anteriormente (item 4.5.1) e, nos tempos de 6, 24 e 48 h, os biofilmes foram raspados, recolhidos com água MiliQ estéril, sonificados e posteriormente filtrados em membranas de 0,22 µm. O material filtrado contendo a matriz dos biofilmes foi congelado a -20 °C e liofilizado para posterior análise.

As proteínas da matriz dos biofilmes foram solubilizadas em ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) diluído em solução aquosa de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Em seguida, 1  $\mu$ L da solução proteica da matriz foi transferida em duplicata para uma placa alvo de aço polido (Bruker Daltonics, Massachusetts, EUA) e misturadas com uma matriz orgânica de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) ( $75 \text{ mg}^{-1}$  de CHCA em etanol / água deionizada / acetonitrilo [1:1:1] com 0,03 % de ácido trifluoroacético) seguido de secagem. Para a aquisição dos espectros de massas, utilizou-se a técnica de *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) conforme proposto por Costa et al., (2012) descrito por Cordeiro et al., (2017). Para tanto, foi utilizado um espectrômetro de massa MALDI-TOF MS Autoflex III (Bruker Daltonics, Massachusetts, EUA) equipado com laser Nd:YAG de 1064 nm, operado no modo refletor positivo com a frequência do laser de 100 Hz, com faixa de detecção de 400 a 5000 m/z. Utilizou-se o peptídeo I (Bruker Daltonics, Massachusetts, EUA) para calibração do equipamento.

Os espectros obtidos a partir dos diferentes tratamentos foram comparados ao controle utilizando o programa de espectrometria de massa de código aberto chamado mMass versão 5.5.0 ([www.mmass.org](http://www.mmass.org); Praga, República Tcheca). Antes de comparar a lista de opções, o processamento de dados foi realizado por Colheita de Picos, Correção da Linha de Base e Suavização (NIEDERMEYER; STROHALM, 2012). Em seguida, os íons parentais foram fragmentados usando o modo LIFT. Os dados foram adquiridos usando o *software* Flex Control e os espectros foram processados usando o *software* Flex Analysis ambos versão 3.3 (Bruker Daltonics, Massachusetts, EUA) de acordo com Biemann (1992).

Os espectros de interesse foram identificados usando o *software* SearchGUI (Compomics Inc.) utilizado para impressão digital de dados de massa (MS) e busca de dados de íons (MS/MS), em face de um banco de dados de proteínas de *C. albicans* ATCC MYA-2876 obtido da base de dados UniProt (<http://www.uniprot.org>; Hinxton, Reino Unido). Para visualizar e analisar os resultados do SearchGUI, utilizou-se uma plataforma independente de mecanismo de busca e de identificação de peptídeos e proteínas denominada PeptideShaker (VAUDEL et al., 2011). As sequências das proteínas anotadas foram recuperadas no formato FASTA a partir do acesso UniProt (<http://www.uniprot.org/batch/>).

#### 4.5.8 Efeito dos antibacterianos em face da tolerância do biofilme de *Candida albicans* a antifúngicos

O efeito de cefepime e amoxicilina sobre a tolerância do biofilme de *C. albicans* ATCC 10231 frente aos antifúngicos foi determinado de acordo com Ferreira et al., (2009), com modificações. Os biofilmes foram formados como descrito anteriormente (item 4.5.1) na presença de cefepime ou amoxicilina na concentração de PP de cada droga. Após 48 h de maturação dos biofilmes a 37 °C, o sobrenadante foi aspirado e os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS estéril. Um novo meio de cultura RPMI-1640 foi adicionado aos poços contendo AMB, FLC, ITC, VRC e CAS (Tabela 2) com base na concentração inibitória mínima (CIM) e 10xCIM de cada droga, conforme CIMs previamente determinadas para células planctônicas. Após 48 h de incubação a 37°C, determinou-se a biomassa e a atividade metabólica dos biofilmes, conforme descrito anteriormente (itens 4.5.1 e 4.5.2, respectivamente). Os testes foram realizados em triplicata.

**Tabela 2:** Antifúngicos utilizados.

Antifúngicos	CIM*	10xCIM	Fabricante
<b>Anfotericina B</b>	0,5 µg/mL	5 µg/mL	Sigma-Aldrich, EUA
<b>Fluconazol</b>	0,25 µg/mL	2,5 µg/mL	Pfizer, BR
<b>Itraconazol</b>	0,25 µg/mL	2,5 µg/mL	Janssen Pharmaceutical, BE
<b>Voriconazol</b>	0,125 µg/mL	1,25 µg/mL	Pfizer, BR
<b>Caspofungina</b>	0,125 µg/mL	1,25 µg/mL	Sigma-Aldrich, EUA

Legenda: BE = Bélgica; BR = Brasil; EUA = Estados Unidos da América; CIM = Concentração Inibitória Mínima. \* = Fonte: Manual M27-A3 (CLSI, 2008).

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias dos dados foram comparadas pelo pós-teste de Tukey. Para a análise dos resultados referentes à curva de sobrevivência foi empregado o método de Kaplan-Meier, e para detecção de diferença entre os grupos, os testes log-rank e Wilcoxon foram utilizados. Para todas as avaliações, o valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism*® 7.0 (*GraphPad Software*, Califórnia, EUA).



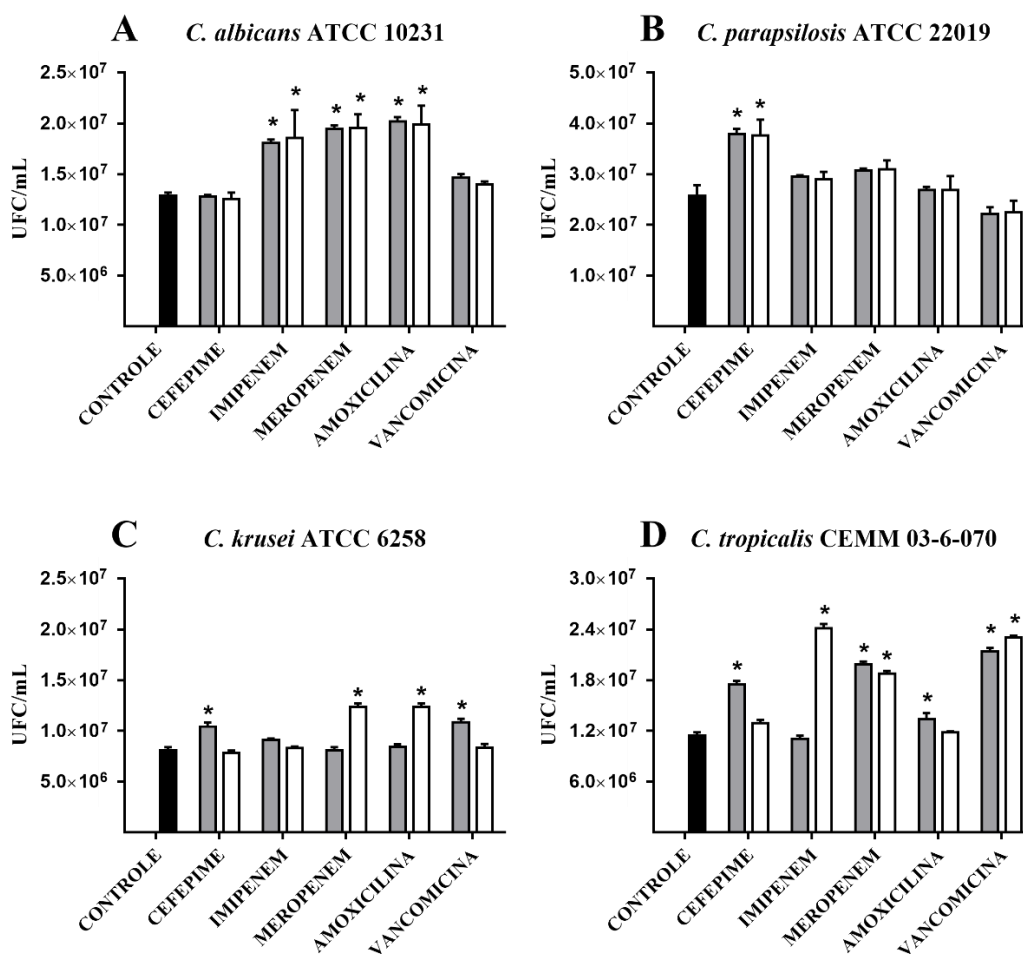
## 5 RESULTADOS

### 5.1 PARTE I

Os resultados obtidos referentes à parte I do presente trabalho foram compilados na forma de manuscrito intitulado “*β-lactam antibiotics and vancomycin increase the growth and virulence of Candida spp.*” publicado no periódico *Future Microbiology*, ISSN 1746-0921, fator de impacto 3.374, qualis CAPES A2 na área de avaliação Medicina I.

#### 5.1.1 Efeito dos antibacterianos em face do crescimento planctônico de *Candida spp.*

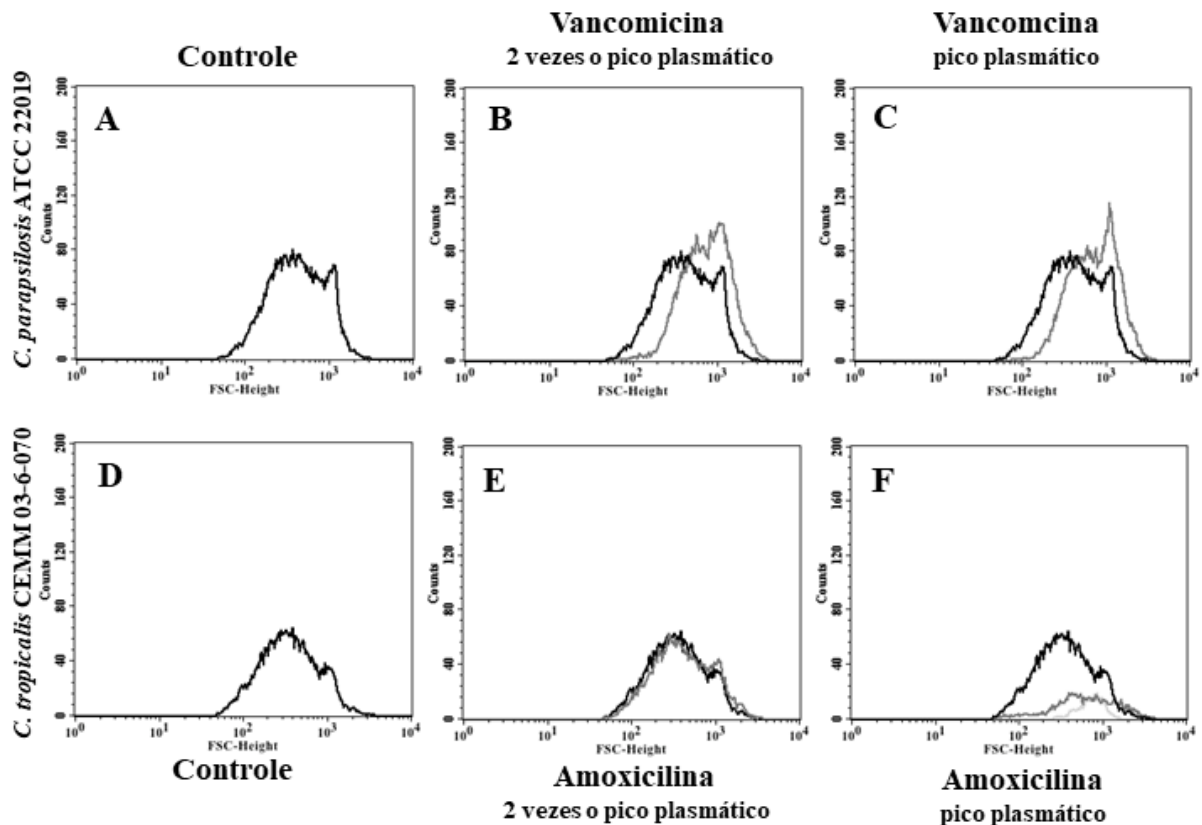
Quanto ao efeito dos antibacterianos sobre o crescimento planctônico de *Candida spp.*, imipenem, meropenem e amoxicilina, em ambas as concentrações testadas, estimularam o crescimento de *C. albicans* ATCC 10231 (Figura 8A) ( $p < 0,05$ ). Além disso, cefepime em ambas as concentrações testadas, aumentou a contagem de células viáveis de *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Figura 8B) ( $p < 0,05$ ). Já para a cepa de *C. krusei* ATCC 6258, cefepime e vancomicina na concentração de 2xPP e, meropenem e amoxicilina na concentração de PP, estimularam o crescimento (Figura 8C) ( $p < 0,05$ ). Por fim, cefepime, vancomicina, meropenem e amoxicilina na concentração de 2xPP e, vancomicina, imipenem e meropenem na concentração de PP, estimularam o crescimento de *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 (Figura 8D) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8:** Efeito dos antibacterianos em face do crescimento de *Candida* spp. em forma planctônica. (A) *C. albicans* ATCC 10231, (B) *C. parapsilosis* ATCC 22019, (C) *C. krusei* ATCC 6258 e (D) *C. tropicalis* CEMM 03-6-070. Barras pretas: controle sem tratamento. Barras cinza: 2 x pico plasmático de cada antibacteriano testado. Barras brancas: pico plasmático de cada antibacteriano testado. \* = diferença estatística comparada ao controle ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.2 Efeito dos antibacterianos em face do volume e complexidade celular de *Candida* spp. em crescimento planctônico

Quanto ao efeito dos antibacterianos em face do volume e complexidade celular de células planctônicas de *Candida* spp. analisados por citometria de fluxo, vancomicina em ambas as concentrações testadas diante *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Figura 9A-C) e amoxicilina na concentração de PP em face de *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 (Figura 9D-F), alteraram o volume celular. As demais condições testadas não modificaram o perfil populacional celular de *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. tropicalis* CEMM 03-6-070.

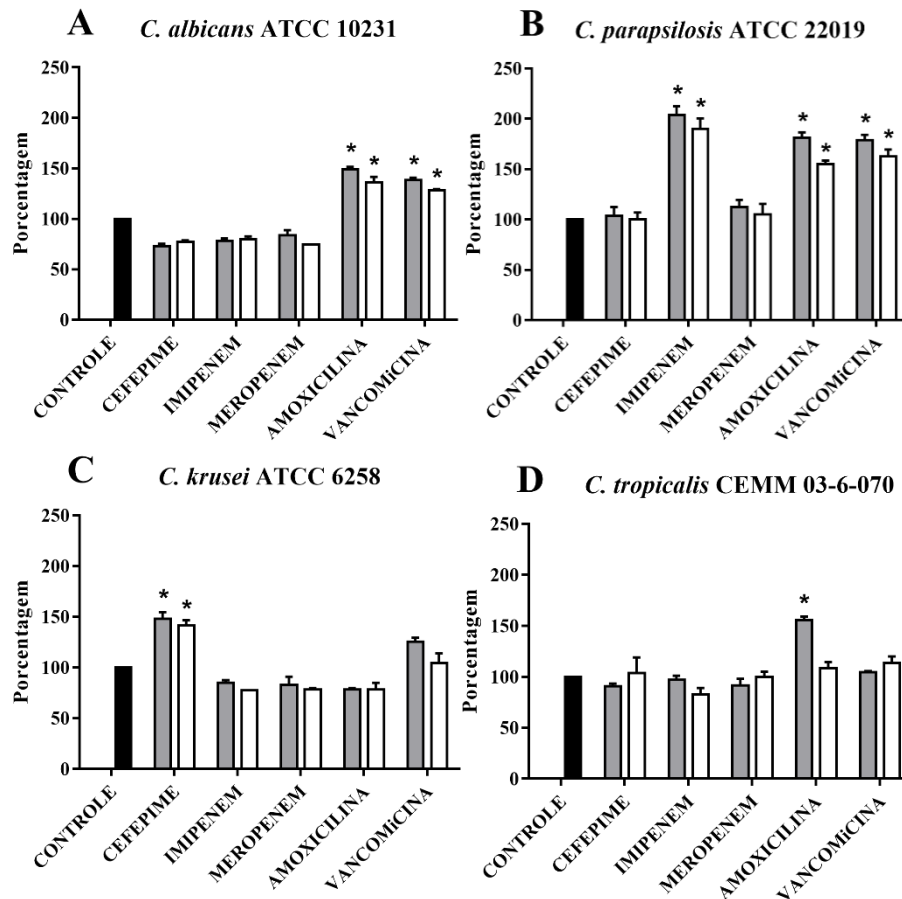


**Figura 9:** Efeito dos antibacterianos, vancomicina e amoxicilina, em face do volume celular de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 em crescimento planctônico analisado por citometria de fluxo. Linhas pretas: controle sem exposição aos antibacterianos; linhas cinzas: células de *Candida* expostas aos antibacterianos. FSC-Height = *Forward Scatter* (Dispersão progressiva – volume celular). (A) Controle – volume celular de *C. parapsilosis* ATCC 22019 sem antibacteriano, média de FSC-Height: 521,24; (B) Vancomicina na concentração de 2 vezes o pico plasmático frente ao volume celular de *C. parapsilosis* ATCC 22019, média de FSC-Height: 839,78; (C) Vancomicina na concentração de pico plasmático frente ao volume celular de *C. parapsilosis* ATCC 22019, média de FSC-Height: 803,47; (D) Controle – volume celular de *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 sem antibacteriano, média de FSC-Height: 445,99; (E) Amoxicilina na concentração de 2 vezes o pico plasmático frente ao volume celular de *C. tropicalis* CEMM 03-6-070, média de FSC-Height: 521,96; (F) Amoxicilina na concentração de pico plasmático frente ao volume celular de *C. tropicalis* CEMM 03-6-070, média de FSC-Height: 784,13.

### 5.1.3 Efeito dos antibacterianos em face da atividade proteolítica de *Candida* spp.

Quanto à análise do efeito dos antibacterianos em face da atividade proteolítica de *Candida* spp. em crescimento planctônico, os antibacterianos amoxicilina e vancomicina, em ambas concentrações testadas, estimularam a atividade proteolítica de *C. albicans* ATCC 10231 (Figura 10A) ( $p < 0,05$ ) após 48 h de cultivo. Já os antibacterianos, amoxicilina, imipenem e vancomicina, em ambas as concentrações testadas, aumentaram a atividade proteolítica de *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Figura 10B) ( $p < 0,05$ ) decorrido 48 h de incubação. O antibacteriano cefepime, em ambas as concentrações testadas, elevou a atividade proteolítica de *C. krusei* ATCC 6258 (Figura 10C) ( $p < 0,05$ ) após 48 h de cultivo.

Enquanto que amoxicilina na concentração de PP aumentou a atividade proteolítica de *C. tropicalis* CEMM 03-6-070, decorridas 48 h de incubação (Figura 10D) ( $p < 0,05$ ). Nenhum dos antibacterianos estimularam a atividade proteolítica nos tempos de 6 e 24 h para todas as cepas de *Candida* analisadas.



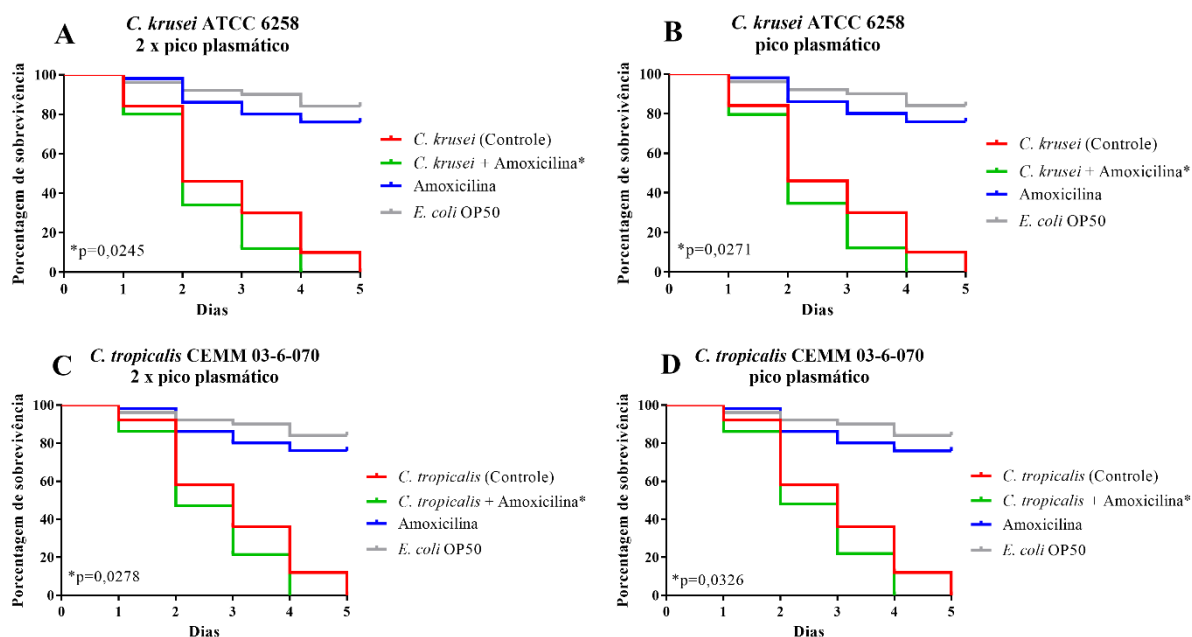
**Figura 10:** Efeito dos antibacterianos em face da atividade proteolítica de *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 em crescimento planctônico de 48 h. (A) *C. albicans* ATCC 10231 (B); *C. parapsilosis* ATCC 22019; (C) *C. krusei* ATCC 6258 (D) *C. tropicalis* CEMM 03-6-070. Barras pretas: controle sem tratamento. Barras cinza: 2 x pico plasmático de cada antibacteriano testado. Barras brancas: pico plasmático de cada antibacteriano testado. \* = diferença estatística comparada ao controle ( $p < 0,05$ ).

#### 5.1.4 Efeito dos antibacterianos em face da atividade fosfolipídica de *Candida* spp.

Quanto ao efeito dos antibacterianos em face da atividade fosfolipídica de *Candida* spp., nenhum dos fármacos testados, em ambas as concentrações utilizadas, modificaram a atividade fosfolipídica de *Candida* spp. após 7 dias de cultivo (Apêndice D).

### 5.1.5 Efeito dos antibacterianos em face da virulência *in vivo* de *Candida* spp.

Referente ao efeito dos antibacterianos em face da virulência *in vivo* de *Candida* spp. (Apêndice E), amoxicilina aumentou a virulência de *C. krusei* ATCC 6258 (Figura 11A-B) nas concentrações de 2xPP ( $p=0,0245$ ) e PP ( $p=0,0271$ ) diante *Caenorhabditis elegans* em modelo de infecção experimental. Amoxicilina também potencializou a virulência de *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 (Figura 11C-D) nas mesmas concentrações testadas, 2xPP ( $p=0,0278$ ) e PP ( $p=0,0326$ ) frente ao modelo utilizado. Os demais antibacterianos testados não alteraram a virulência de *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. tropicalis* CEMM 03-6-070.



**Figura 11:** Efeito de amoxicilina em face da virulência *in vivo* de *C. krusei* ATCC 6258 e *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 em modelo de infecção experimental utilizando *Caenorhabditis elegans*. (A) *C. krusei* ATCC 6258 – 2 x pico plasmático; (B) *C. krusei* ATCC 6258 – pico plasmático; (C) *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 – 2 x pico plasmático; (D) *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 – pico plasmático. \* = diferença estatística comparada ao controle ( $p<0,05$ ).

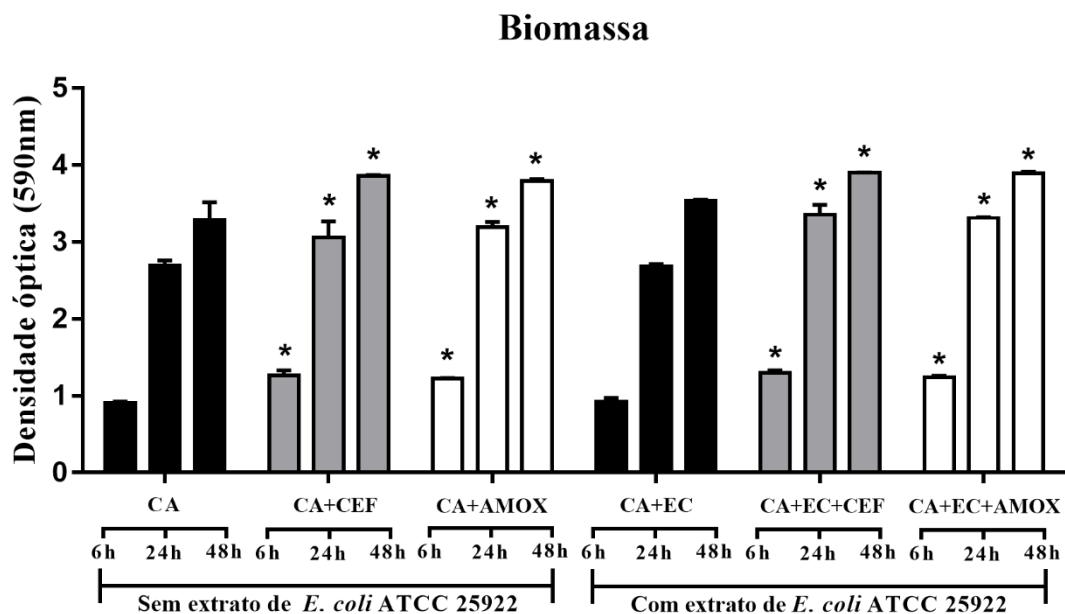
## 5.2 PARTE II

Os resultados obtidos referentes à parte II do presente estudo proporcionaram a confecção do manuscrito intitulado “*Cefepime and amoxicillin increase metabolism and enhance caspofungin tolerance of Candida albicans biofilms*” submetido ao periódico

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, ISSN 1098-6596, fator de impacto 4.255, qualis CAPES A2 na área de avaliação Medicina I.

### 5.2.1 Efeito dos antibacteriano em face da biomassa do biofilme produzido por *Candida albicans*

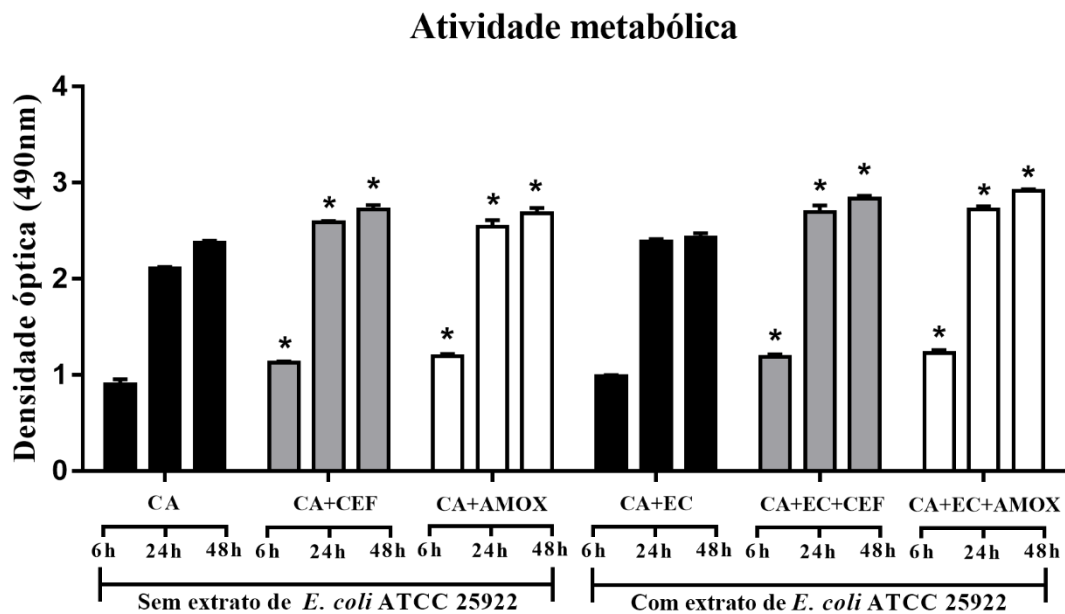
Cefepime e amoxicilina estimularam a produção de biomassa do biofilme de *C. albicans* ATCC 10231 em todos os tempos de análise, 6, 24 e 48 h (Figura 12) ( $p < 0,05$ ). Porém, os extratos de biofilme de *E. coli* ATCC 25922 tratados com cefepime ou amoxicilina não interferiram na produção de biofilme de *C. albicans* ATCC 10231, quando comparado com os mesmos antibacterianos testados isoladamente ( $p > 0,05$ ), embora tenha apresentado diferença significativa comparado ao extrato de biofilme de *E. coli* ATCC 25922 livre de antibacterianos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12:** Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da biomassa do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231. CA = *C. albicans* (Controle); CA+CEF = *C. albicans* + Cefepime; CA+AMOX = *C. albicans* + Amoxicilina; CA+EC = *C. albicans* + *E. coli* (Controle); CA+EC+CEF = *C. albicans* + *E. coli* + Cefepime; CA+EC+AMOX = *C. albicans* + *E. coli* + Amoxicilina. Barras pretas: controles. Barras cinza: tratamento com cefepime. Barras brancas: tratamento com amoxicilina. Cada grupo de barras contém as análises de 6, 24 e 48 h, respectivamente. \* = diferença estatística comparada ao respectivo controle ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.2 Efeito dos antibacterianos em face da atividade metabólica do biofilme produzido por *Candida albicans*

A atividade metabólica dos biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231 foi aumentada na presença dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em todos os tempos de análise, 6, 24 e 48 h (Figura 13) ( $p < 0,05$ ). Todavia, a adição dos extratos de biofilme de *E. coli* ATCC 25922 tratados com cefepime ou amoxicilina não modificou a atividade metabólica dos biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231, quando comparados com os mesmos antibacterianos testados isoladamente ( $p > 0,05$ ), mesmo tendo apresentado diferença comparado ao biofilme de *C. albicans* ATCC 10231 crescido na presença de extrato de *E. coli* ATCC 25922 livre de antibacterianos ( $p < 0,05$ ).

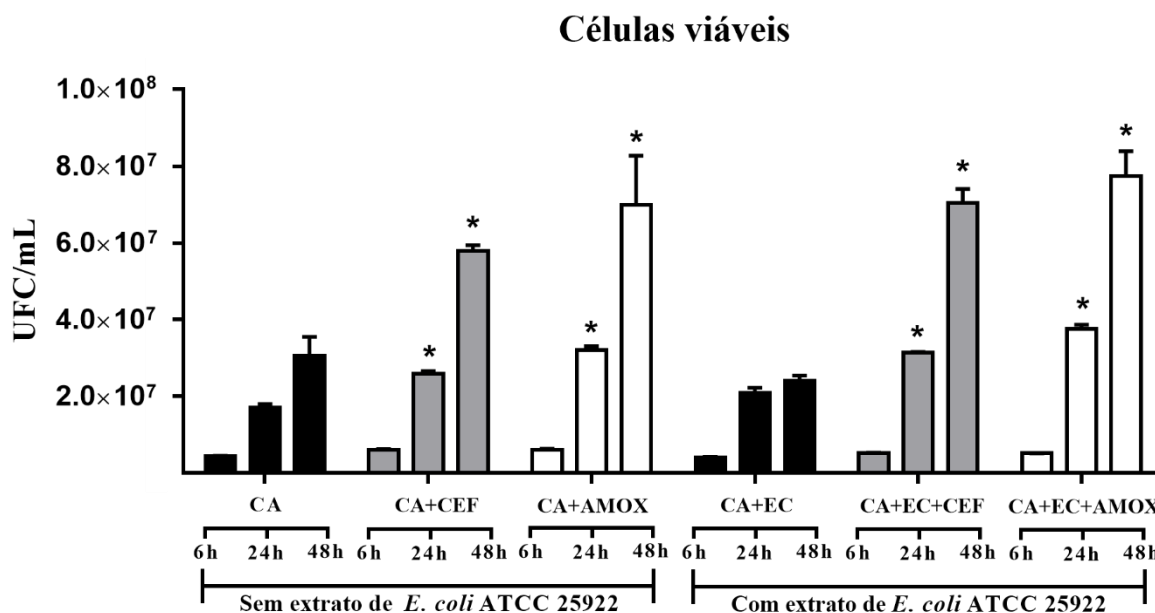


**Figura 13:** Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da atividade metabólica do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231. CA = *C. albicans* (Controle); CA+CEF = *C. albicans* + Cefepime; CA+AMOX = *C. albicans* + Amoxicilina; CA+EC = *C. albicans* + *E. coli* (Controle); CA+EC+CEF = *C. albicans* + *E. coli* + Cefepime; CA+EC+AMOX = *C. albicans* + *E. coli* + Amoxicilina. Barras pretas: controles. Barras cinza: tratamento com cefepime. Barras brancas: tratamento com amoxicilina. Cada grupo de barras contém as análises de 6, 24 e 48 h, respectivamente. \* = diferença estatística comparada ao respectivo controle ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.3 Efeito dos antibacterianos em face da detecção de células viáveis do biofilme produzido por *Candida albicans*

Os antibacterianos cefepime e amoxicilina intensificaram a quantidade de células viáveis do biofilme de *C. albicans* ATCC 10231 após 48 h, sem interferir nos tempos de 6 e

24 h (Figura 14) ( $p < 0,05$ ). Entretanto, os extratos de biofilme de *E. coli* ATCC 25922 tratados com cefepime ou amoxicilina não interferiram na quantidade de células viáveis de *C. albicans* ATCC 10231, comparado com os mesmos antibacterianos testados isoladamente ( $p > 0,05$ ), embora tenha apresentado diferença estatística quando comparado ao extrato de biofilme de *E. coli* ATCC 25922 livre de antibacterianos ( $p < 0,05$ ).



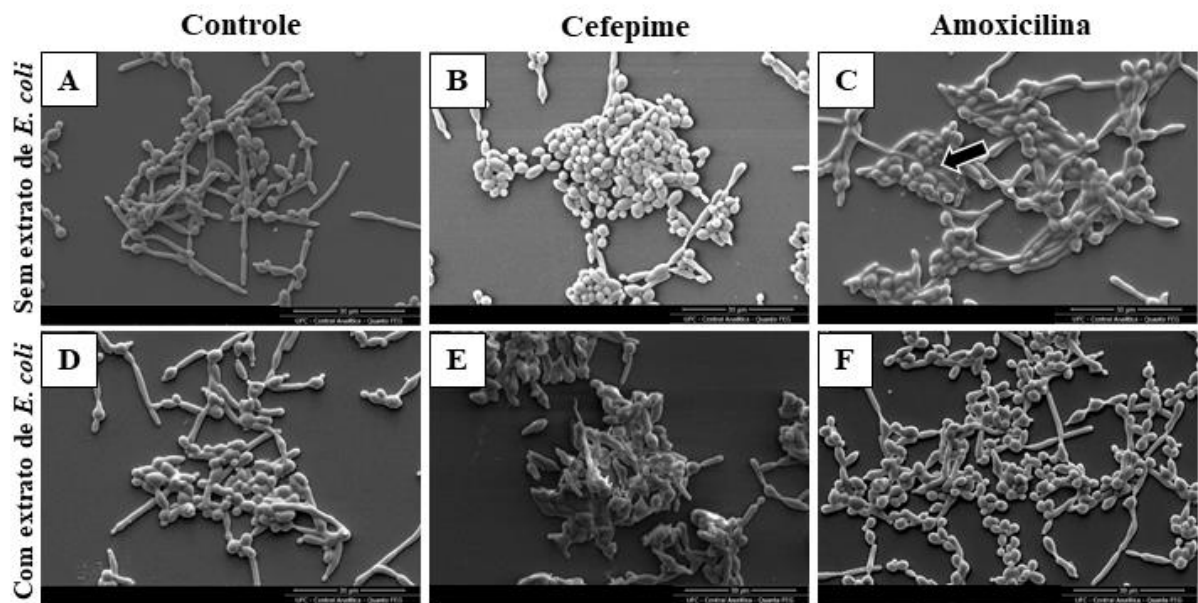
**Figura 14:** Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da detecção de células viáveis do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231. CA = *C. albicans* (Controle); CA+CEF = *C. albicans* + Cefepime; CA+AMOX = *C. albicans* + Amoxicilina; CA+EC = *C. albicans* + *E. coli* (Controle); CA+EC+CEF = *C. albicans* + *E. coli* + Cefepime; CA+EC+AMOX = *C. albicans* + *E. coli* + Amoxicilina. Barras pretas: controles. Barras cinza: tratamento com cefepime. Barras brancas: tratamento com amoxicilina. Cada grupo de barras contém as análises de 6, 24 e 48 h, respectivamente. \* = diferença estatística comparada ao respectivo controle ( $p < 0,05$ ).

#### 5.2.4 Efeito dos antibacterianos em face da morfologia e ultraestrutura do biofilme produzido por *Candida albicans*

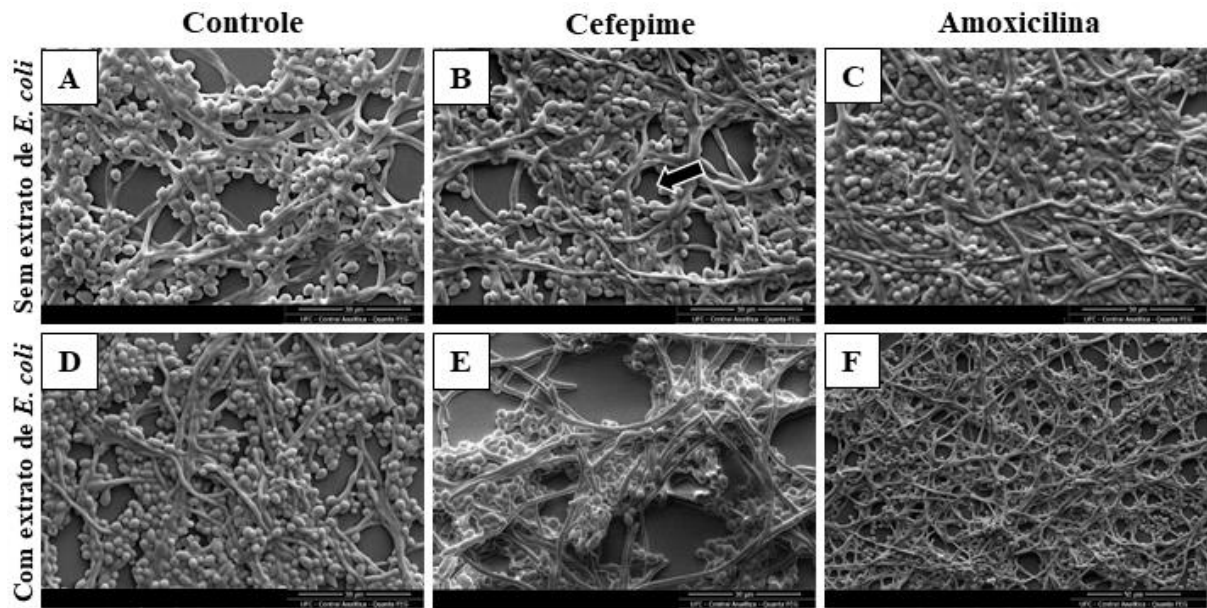
Quanto à morfologia e ultraestrutura de biofilmes produzidos por *C. albicans* ATCC 10231 analisados por MEV, observa-se que após 6 h (Figura 15) de formação, os biofilmes são formados por microcolônias celulares aderidas ao substrato, compostas por blastoconídeos e pseudo-hifas. Nota-se ainda o início da produção da matriz extracelular que envolve as células. Decorridas 24 h de formação (Figura 16), observa-se um aumento considerável na quantidade de blastoconídeos e pseudo-hifas alongadas aderidas, formando estruturas densas e organizadas, dispostas em multicamadas celulares com início da formação de estruturas



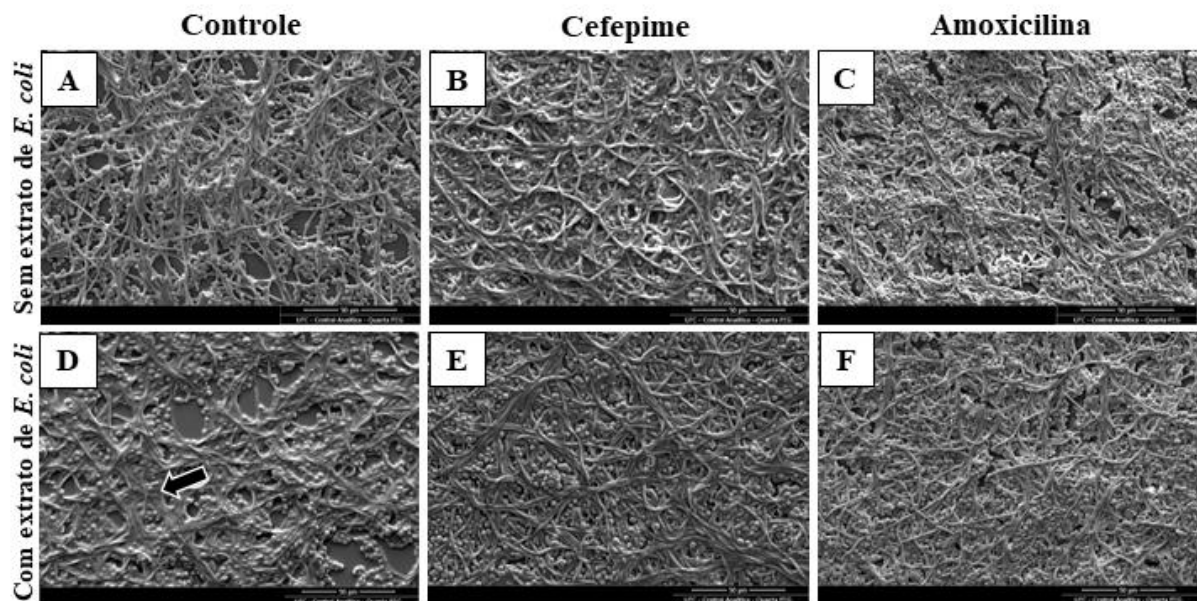
tubulares em forma de canais. Após a maturação dos biofilmes em 48 h (Figura 17), observa-se uma maior densidade celular, composta de blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas verdadeiras alongadas. De maneira geral, não se evidencia diferenças morfológicas significativas nos biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231, tratados com cefepime ou amoxicilina ou com os extratos de *E. coli* ATCC 25922 tratados com os antibacterianos mencionados na mesma concentração, comparados com seus respectivos controles.



**Figura 15:** Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da morfologia e ultraestrutura do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231 analisado por microscopia eletrônica de varredura – Etapa de adesão: 6 h. (A) *C. albicans* (Controle); (B) *C. albicans* + Cefepime; (C) *C. albicans* + Amoxicilina; (D) *C. albicans* + *E. coli* (Controle); (E) *C. albicans* + *E. coli* + Cefepime; (F) *C. albicans* + *E. coli* + Amoxicilina. Seta preta = início da produção de matriz extracelular. Aumento de 2.000 vezes.



**Figura 16:** Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da morfologia e ultraestrutura do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231 analisado por microscopia eletrônica de varredura – Biofilme em formação: 24 h. (A) *C. albicans* (Controle); (B) *C. albicans* + Cefepime; (C) *C. albicans* + Amoxicilina; (D) *C. albicans* + *E. coli* (Controle); (E) *C. albicans* + *E. coli* + Cefepime; (F) *C. albicans* + *E. coli* + Amoxicilina. Seta preta = estrutura tubular em forma de canal. Aumento de 2.000 vezes.



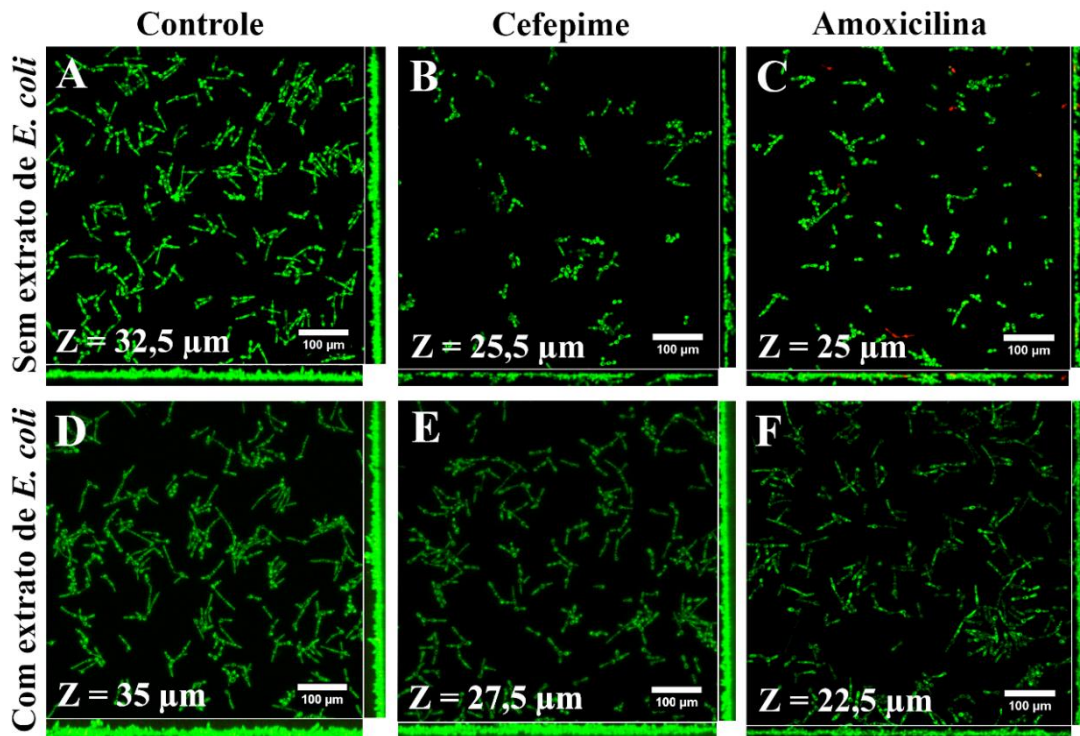
**Figura 17:** Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da morfologia e ultraestrutura do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231 analisado por microscopia eletrônica de varredura – Biofilme maduro: 48 h. (A) *C. albicans* (Controle); (B) *C. albicans* + Cefepime; (C) *C. albicans* + Amoxicilina; (D) *C. albicans* + *E. coli* (Controle); (E) *C. albicans* + *E. coli* + Cefepime; (F) *C. albicans* + *E. coli* + Amoxicilina. Seta preta = células envoltas pela matriz extracelular. Aumento de 2.000 vezes.

Quanto à morfologia e ultraestrutura de biofilmes produzidos por *C. albicans* ATCC 10231 analisados por microscopia confocal, observa-se que após 6 h (Figura 18) de formação, os biofilmes são constituídos por microcolônias celulares viáveis (verde) em sua maioria, com escassez de células inviáveis (vermelho), as quais se encontram aderidas ao substrato, e são

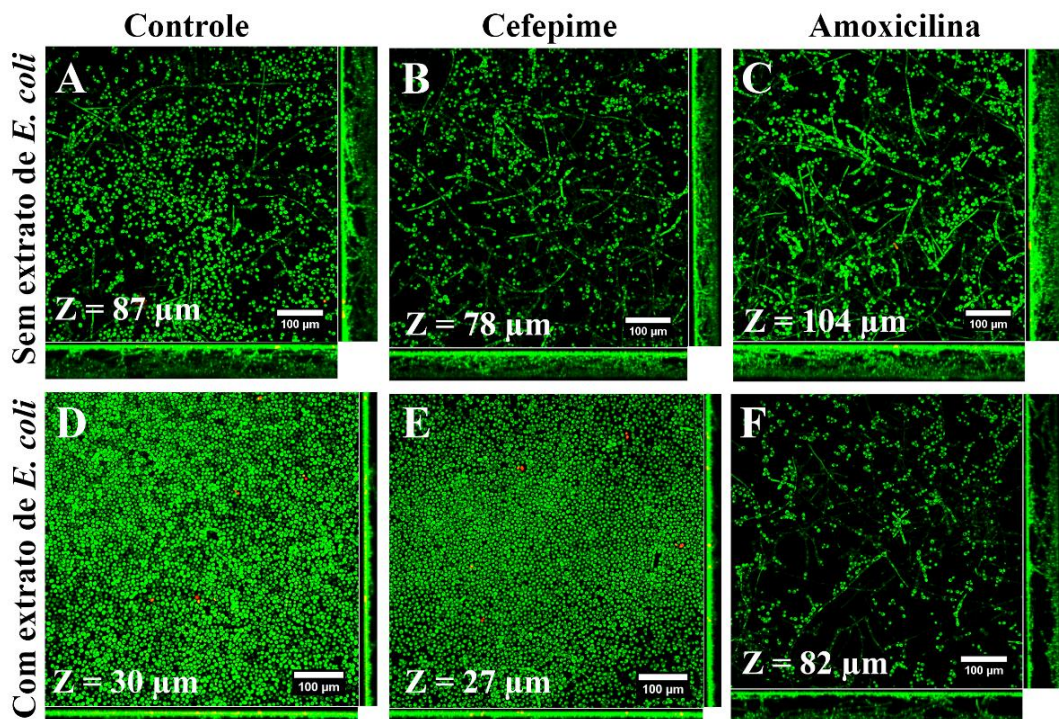
compostas por blastoconídeos e pseudo-hifas. Nesse momento inicial de análise, os tratamentos com cefepime e amoxicilina ou com os extratos de *E. coli* ATCC 25922 tratados com os antibacterianos mencionados na mesma concentração, diminuíram o biovolume (Figura 21A) e a espessura (Figura 21D) dos biofilmes produzidos por *C. albicans* ATCC 10231 no momento de adesão ( $p>0,05$ ).

Decorridas 24 h de formação (Figura 19), observa-se de maneira geral um aumento significativo na quantidade de células viáveis, com predomínio de blastoconídeos e pseudo-hifas alongadas aderidas, formando biofilmes mais espessos e volumosos. O tratamento com amoxicilina aumentou o biovolume e a espessura (Figura 21) do biofilme de *C. albicans* ATCC 10231, comparado ao controle ( $p<0,05$ ). Ao passo que, o tratamento com cefepime diminuiu o biovolume (Figura 21B) e a espessura (Figura 21E) do biofilme de *C. albicans* ATCC 10231, comparado ao seu respectivo controle ( $p>0,05$ ). Os tratamentos com extrato de *E. coli* ATCC 25922 sozinho ou tratado com amoxicilina ou cefepime reduziram o biovolume e a espessura do biofilme de *C. albicans* ATCC 10231, quando comparados ao tratamento com os antibacterianos isoladamente ( $p>0,05$ ).

Após a maturação dos biofilmes em 48 h (Figura 20), permanece a predominância de blastoconídeos e pseudo-hifas alongadas aderidas, ressaltando a presença de biofilmes espessos e volumosos, o que confere maior robustez. O tratamento com amoxicilina aumentou o biovolume (Figura 21C) e a espessura (Figura 21F) ( $p<0,05$ ). Porém, a adição do extrato do biofilme de *E. coli* ATCC 25922 tratado com cefepime não modificou o biovolume e a espessura ( $p>0,05$ ), ao passo que a adição do extrato do biofilme de *E. coli* ATCC 25922 tratado com amoxicilina reduziu o biovolume e a espessura, quando comparados ao tratamentos com os antibacterianos testados isoladamente ( $p<0,05$ ).

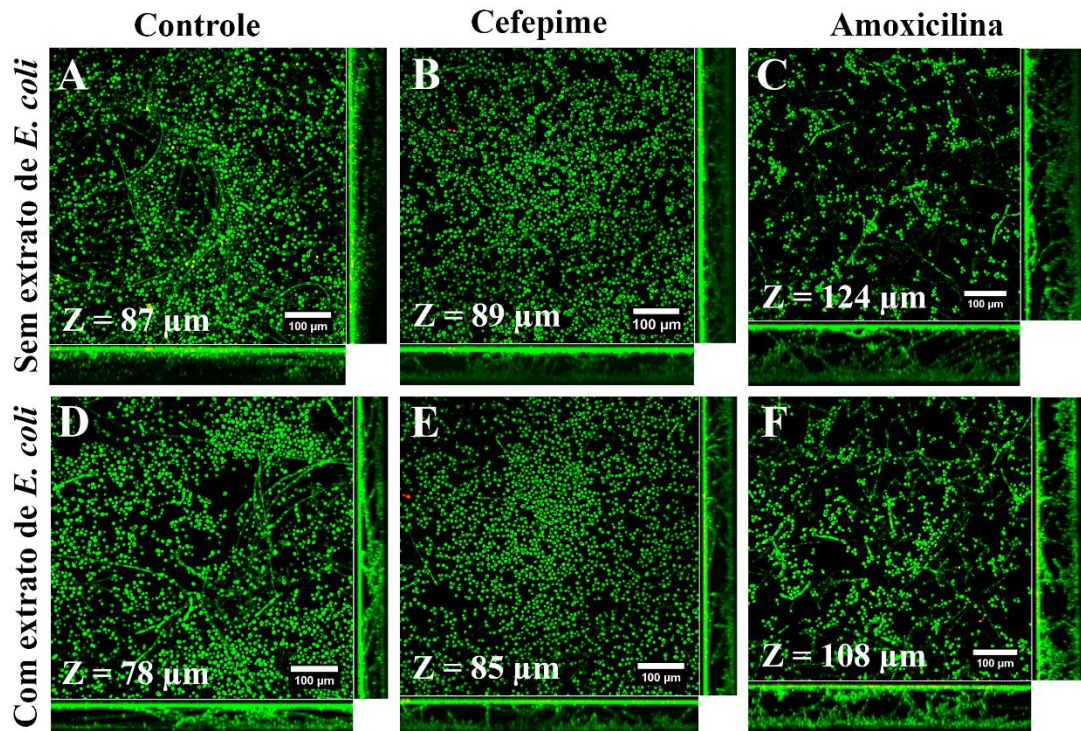


**Figura 18:** Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da morfologia e ultraestrutura do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231 analisado por microscopia confocal – Etapa de adesão: 6 h. (A) *C. albicans* (Controle); (B) *C. albicans* + Cefepime; (C) *C. albicans* + Amoxicilina; (D) *C. albicans* + *E. coli* (Controle); (E) *C. albicans* + *E. coli* + Cefepime; (F) *C. albicans* + *E. coli* + Amoxicilina. Z = altura do biofilme. Aumento de 400 vezes.

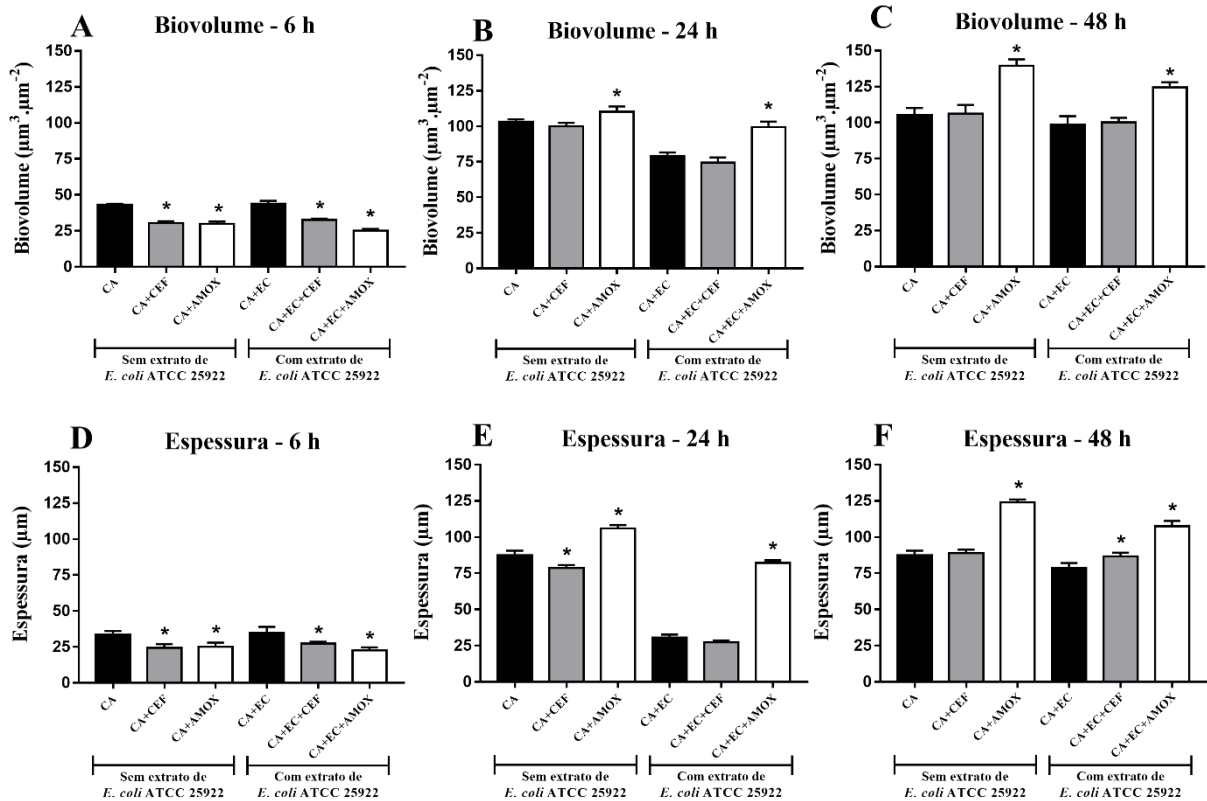


**Figura 19:** Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da morfologia e ultraestrutura do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231 analisado por microscopia confocal – Biofilme em formação: 24 h. (A) *C. albicans* (Controle); (B) *C. albicans* + Cefepime; (C) *C. albicans* + Amoxicilina; (D) *C. albicans* + *E. coli* (Controle); (E) *C. albicans* + *E. coli* + Cefepime; (F) *C. albicans* + *E. coli* + Amoxicilina. Z = altura do biofilme. Aumento de 400 vezes.





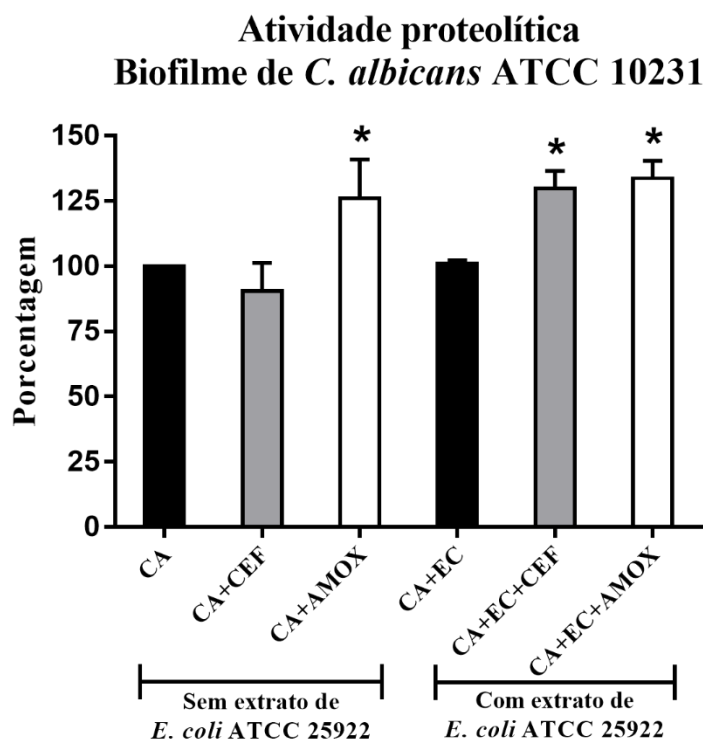
**Figura 20:** Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da morfologia e ultraestrutura do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231 analisado por microscopia confocal – Biofilme maduro: 48 h. (A) *C. albicans* (Controle); (B) *C. albicans* + Cefepime; (C) *C. albicans* + Amoxicilina; (D) *C. albicans* + *E. coli* (Controle); (E) *C. albicans* + *E. coli* + Cefepime; (F) *C. albicans* + *E. coli* + Amoxicilina. Z = altura do biofilme. Aumento de 400 vezes.



**Figura 21:** Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face do biovolume e à espessura do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231 analisado por microscopia confocal. (A) Etapa de adesão: Biovolume – 6 h; (B) Biofilme em formação: Biovolume – 24 h; (C) Biofilme maduro: Biovolume – 48 h; (D) Etapa de adesão: Espessura – 6 h; (E) Biofilme em formação: Espessura – 24 h; (F) Biofilme maduro: Espessura – 48 h. CA = *C. albicans* (Controle); CA+CEF = *C. albicans* + Cefepime; CA+AMOX = *C. albicans* + Amoxicilina; CA+EC = *C. albicans* + *E. coli* (Controle); CA+EC+CEF = *C. albicans* + *E. coli* + Cefepime; CA+EC+AMOX = *C. albicans* + *E. coli* + Amoxicilina. Barras pretas: controles. Barras cinza: tratamento com cefepime. Barras brancas: tratamento com amoxicilina. \* = diferença estatística comparada ao respectivo controle ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.5 Efeito dos antibacterianos em face da atividade proteolítica do biofilme produzido por *Candida albicans*

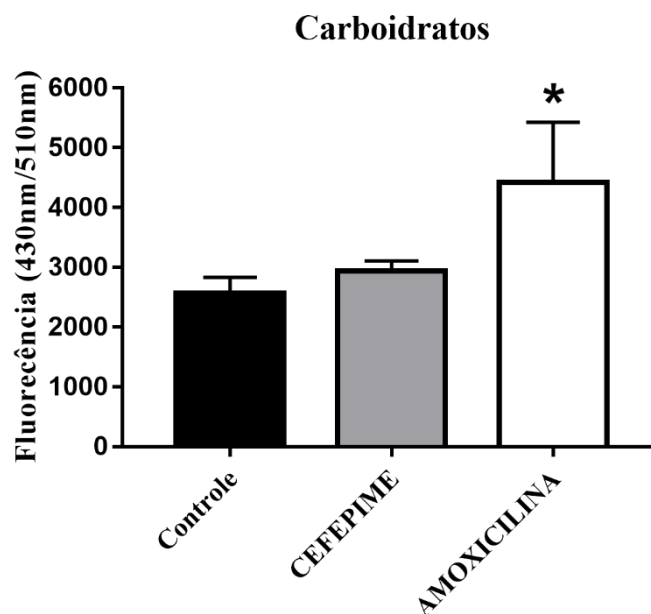
Os tratamentos com amoxicilina ou com os extratos de *E. coli* ATCC 25922 tratados com cefepime ou amoxicilina na mesma concentração, aumentaram a atividade proteolítica do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231 (Figura 22) após 48 h de formação ( $p < 0,05$ ). Porém, cefepime testado isoladamente não modificou a atividade proteolítica do biofilme de *C. albicans* ATCC 10231. Não houve diferença na atividade proteolítica nos tempos de 6 e 24 h.



**Figura 22:** Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da atividade proteolítica do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231. Barras pretas: controles. Barras cinza: tratamento com cefepime. Barras brancas: tratamento com amoxicilina. CA = *C. albicans* (Controle); CA+CEF = *C. albicans* + Cefepime; CA+AMOX = *C. albicans* + Amoxicilina; CA+EC = *C. albicans* + *E. coli* (Controle); CA+EC+CEF = *C. albicans* + *E. coli* + Cefepime; CA+EC+AMOX = *C. albicans* + *E. coli* + Amoxicilina. Análise de 48 h. \* = diferença estatística comparada ao respectivo controle ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.6 Efeito dos antibacterianos em face da quantificação de carboidratos e proteínas do biofilme de *Candida albicans*

Somente o tratamento com amoxicilina aumentou a quantidade de carboidratos, provavelmente quitina e 1,3- $\beta$ -glucanos, do biofilme de *C. albicans* ATCC 10231 corado por calcoflúor-white ( $p < 0,05$ ) (Figura 23). Não foram observadas diferenças estatísticas nos testes utilizando vermelho do Congo, safranina ou SYPRO® Ruby, quando os biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231 foram tratados com amoxicilina ou cefepime ( $p > 0,05$ ) (Apêndice F).

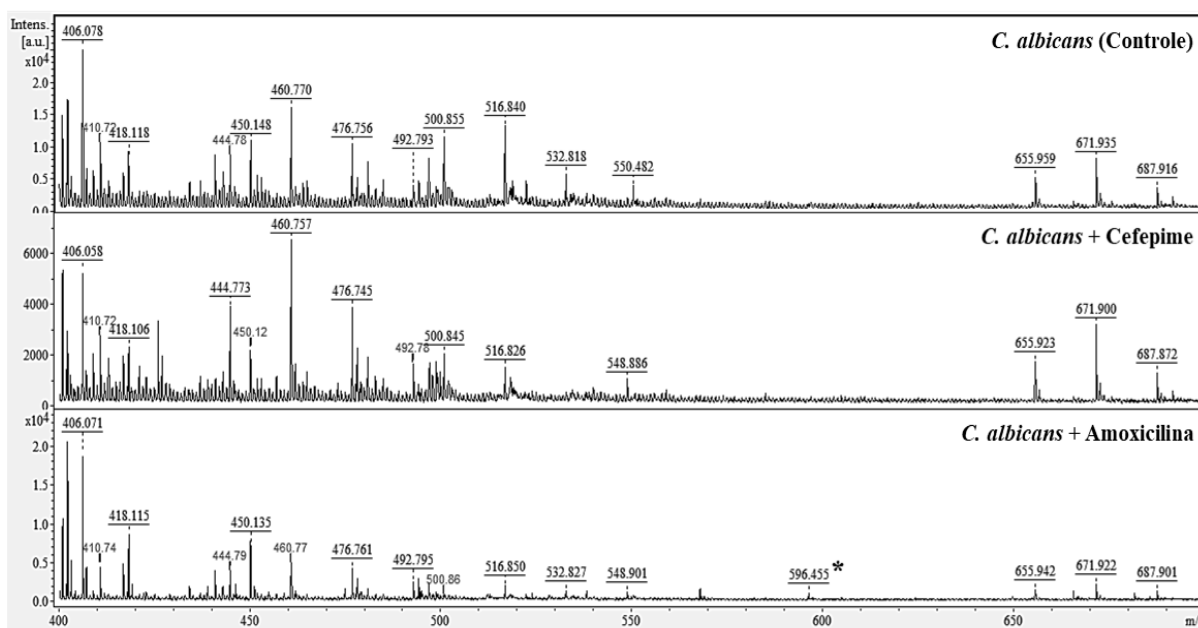


**Figura 23:** Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da quantificação de carboidratos do biofilme de *C. albicans* ATCC 10231. Barras pretas: controles. Barras cinza: tratamento com cefepime. Barras brancas: tratamento com amoxicilina. Análise de 48 h. \* = diferença estatística comparada ao controle ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.7 Efeito dos antibacterianos em face da composição da matriz do biofilme produzido por *Candida albicans*

As matrizes dos biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231 tratados com cefepime ou amoxicilina (Figura 24) mostraram um grupo de picos com m/z de 399,95 – 714,30 Da. A análise comparativa dos espectros de massa no *software* mMass mostrou que o tratamento com cefepime em face do biofilme de *C. albicans* ATCC 10231 suprimiu o pico de 532,818 Da em relação ao biofilme não tratado. Por outro lado, o tratamento com amoxicilina promoveu o surgimento de um pico de 596,455 Da encontrado somente nessa condição teste. A análise MS/MS do pico de 596,455 Da fragmentado foi descrita pelo *software* SearchGUI como uma chaperona de choque térmico Hsp70 situada no Gene KAR2, quando comparada a uma base de dados de *C. albicans* ATCC MYA-2876. O código de acesso da proteína no UniProtKB é A0A1D8PG96.

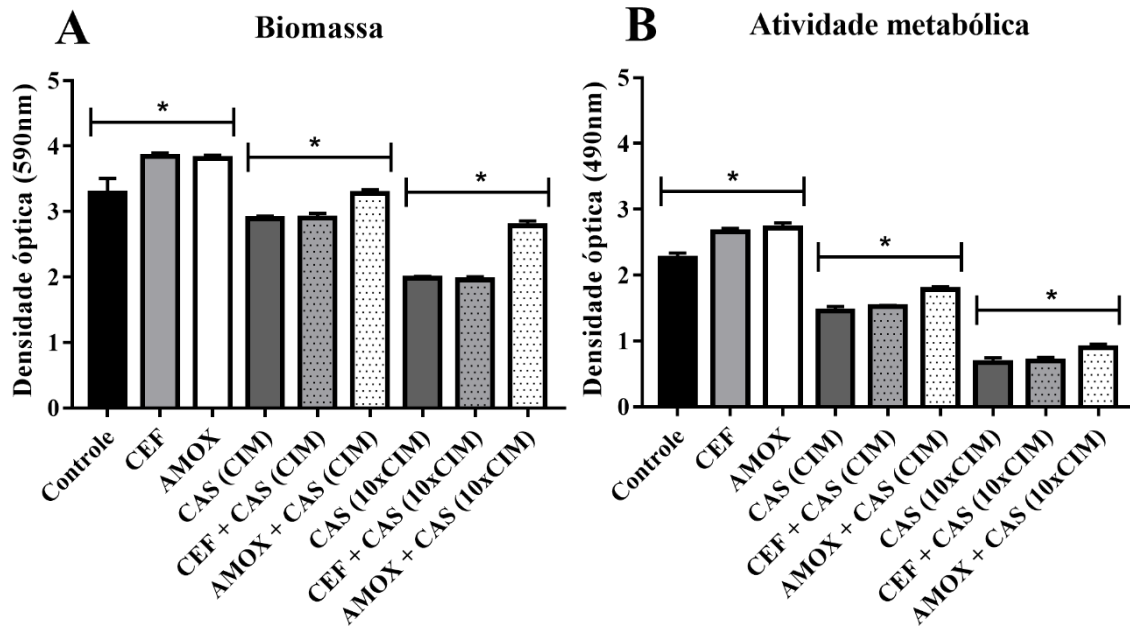




**Figura 24:** Efeito dos antibacterianos cefepime e amoxicilina em face da composição da matriz do biofilme produzido por *C. albicans* ATCC 10231 analisado por *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS). \* = espectro de massa de 596,455 Da que foi fragmentado e identificado como Hsp70.

### 5.2.8 Efeito dos antibacterianos em face da tolerância do biofilme de *Candida albicans* a antifúngicos

O biofilme maduro de *C. albicans* ATCC 10231 formado na presença de amoxicilina tornou-se mais tolerante à caspofungina nas concentrações de CIM e 10xCIM, aumentando a biomassa (Figura 25A) e a atividade metabólica (Figura 25B) ( $p < 0,05$ ). O tratamento com amoxicilina ou cefepime não modificou a tolerância do biofilme de *C. albicans* ATCC 10231 aos demais antifúngicos, AMB, FLC, ITC e VRC ( $p < 0,05$ ) (Apêndice G).



**Figura 25:** Efeito de cefepime e amoxicilina em face da tolerância do biofilme produzido por *Candida albicans* ATCC 10231 à caspofungina. (A) Biomassa; (B) atividade metabólica; CEF = cefepime; AMOX = amoxicilina; CIM = concentração inibitória mínima; Barras pretas: controles. Barras cinzas claras: tratamento com cefepime. Barras brancas: tratamento com amoxicilina. Barras cinzas escuras: tratamento apenas com caspofungina. Barras pontilhadas: tratamento com antibacterianos e caspofungina. \* = Diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

Já é bem conhecido que o uso de antibacterianos de amplo espectro pode alterar a composição da microbiota do hospedeiro, sobretudo a de mucosas, favorecendo à colonização desses locais por *Candida* spp. (SAMONIS et al., 2006a; 2006b; 2013). No entanto, pouco se sabe sobre o efeito de antibacterianos de amplo espectro como os  $\beta$ -lactâmicos, incluindo cefepime, imipenem, meropenem e amoxicilina e do glicopeptídeo vancomicina sobre o crescimento planctônico e virulência de *Candida* spp., bem como diante do biofilme produzido por *C. albicans*.

Dessa maneira, o presente trabalho investigou o papel dos principais antibacterianos utilizados na prática médica no tratamento de pacientes neutropênicos febris (GUSTINETTI; MIKULSKA, 2016) sobre as principais espécies de *Candida* causadoras de candidemia (NEGRI et al., 2010). Estudos realizados por Samonis et al., (2006a; 2006b; 2013) investigaram o papel de antibacterianos de mesma classe testados no presente estudo em face da colonização por *C. albicans* do trato gastrointestinal de murinos e também evidenciaram aumento substancial na contagem de células viáveis nas fezes dos camundongos. Porém, nos estudos de Samonis et al., (2006a; 2006b; 2013) não foi revelado se a proliferação de *C. albicans* no trato gastrointestinal de camundongos foi decorrente da eliminação da microbiota bacteriana ou, se os antibacterianos induzem de maneira direta o crescimento celular da levedura. No presente estudo, evidenciou-se que, de maneira geral, os antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e vancomicina estimulam o crescimento planctônico aumentando a contagem de células viáveis de *Candida* spp. O aumento do crescimento celular *in vitro* pode refletir no crescimento *in vivo* aumentando as chances de *Candida* spp. de conseguir colonizar tecidos e posteriormente causar infecção.

O próximo passo foi investigar o papel dos antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e de vancomicina sobre o volume e complexidade celular de *Candida* spp. analisados por citometria de fluxo. Muitos trabalhos têm utilizado a citometria de fluxo para estudar o comportamento celular de patógenos fúngicos, sobretudo espécies de *Candida* diante drogas (LÉONARD et al., 2017; SILVA et al., 2016; ANDRADE-NETO et al., 2014). No presente trabalho, destacou-se que amoxicilina em face de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e vancomicina diante *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 alteram o perfil populacional celular dessas espécies, aumentando o volume celular. É possível que essa mudança tenha ocorrido devido à indução da filamentação das células fúngicas, ou pelo aumento na quantidade do conteúdo celular,

como organelas e vesículas. No entanto, estudos mais aprofundados são necessários para elucidação dos mecanismos envolvidos nesse fenômeno.

No presente estudo, também destacou-se que os antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e vancomicina propiciam um aumento na atividade proteolítica por *Candida* spp. a depender do antibacteriano utilizado. Estudos comprovam que a atividade enzimática, sobretudo de proteases por *Candida* spp. é considerada um importante fator de virulência, pois desempenha papel crucial para o crescimento celular, adesão e penetração em tecidos do hospedeiro que pode culminar na invasão da corrente sanguínea e conseqüentemente ocasionar candidemia (CORDEIRO et al., 2015b; 2017; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015). Assim, a utilização de antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e vancomicina no tratamento empírico de pacientes de risco podem agravar a situação, caso o agente etiológico seja *Candida* spp., uma vez que a secreção de proteases é um importante fator de virulência para o fungo. Em contrapartida, a atividade fosfolipídica não foi alterada pelo tratamento com os antibacterianos, o que demonstra que esses fármacos não participam das vias metabólicas envolvidas na produção de fosfolipases.

Analizou-se ainda o papel dos antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e de vancomicina sobre a virulência *in vivo* de *Candida* spp. em modelo de infecção experimental utilizando o nematódeo *C. elegans*. Evidenciou-se que amoxicilina aumenta a virulência de *C. krusei* ATCC 6258 e *C. tropicalis* CEMM 03-6-070 diante do modelo de infecção experimental utilizado. Estudos utilizando *C. elegans* como modelo permitem a identificação de compostos que modulam as respostas imunitárias ou afetam fatores de virulência de fungos que são apenas expressos durante a infecção. Além disso, fornecem informações importantes da relação parasita-hospedeiro, inclusive, da resposta do sistema imune inato (PUKKILA-WORLEY; AUSUBEL; MYLONAKIS, 2011). Assim, diante do exposto, o tratamento com amoxicilina pode aumentar as chances de complicações das infecções causadas por *C. krusei* e *C. tropicalis*, uma vez que esse antibacteriano potencializa a virulência dessas espécies.

A próxima etapa do presente estudo foi averiguar a influência dos antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos em face da produção de biofilme por *C. albicans* ATCC 10231, a principal espécie de *Candida* como patógeno humano e animal (VOGEL et al., 2013). Nesta etapa, realizou-se um *screening* com os antibacterianos cefepime, imipenem, meropenem, amoxicilina e vancomicina diante da produção de biomassa do biofilme de *C. albicans* ATCC 10231, destacando-se que apenas cefepime e amoxicilina estimulam a produção de biomassa; por esse motivo, a escolha desses antibacterianos para a realização das demais etapas experimentais.

Já foi descrito na literatura que interações entre fungos e bactérias podem ser benéficas para *C. albicans*. Por exemplo, moléculas de lipopolissacarídeos, que são importantes moduladores presentes nas paredes celulares bacterianas, podem reagir diretamente com *C. albicans* aumentando a virulência, contribuindo para a coinfeção por *C. albicans* e *E. coli* (ROGERS et al., 2013). Neste cenário, o uso de antibacterianos de amplo espectro, como os  $\beta$ -lactâmicos, eliminam a microbiota bacteriana, liberando moléculas de muramyl dipeptídeos (MDPs), que são subunidades de peptidoglicano que estimulam a transição de levedura para hifa, que é intimamente relacionada com a virulência de *C. albicans*. Assim, ocorre falha no controle do crescimento fúngico e da filamentação, aumentando o risco de infecção sistêmica por *Candida* (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015). Com a finalidade de simular a ação de cefepime e amoxicilina sobre a interação de *C. albicans* com bactérias da microbiota humana, investigou-se, também, o efeito de extratos obtidos a partir da produção de biofilmes de *E. coli* ATCC 25922 tratados com os antibacterianos mencionados diante da formação de biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231. Porém, o tratamento com os extratos, de maneira geral, não modificou a produção de biofilme, quando comparado aos antibacterianos testados isoladamente. Dessa forma, os extratos não foram analisados nos testes de quantificação de carboidratos e proteínas, composição da matriz e tolerância aos antifúngicos.

O primeiro passo foi avaliar a produção de biomassa, atividade metabólica e contagem de células viáveis dos biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231 tratados com cefepime ou amoxicilina ou, com os extratos de *E. coli* ATCC 25922 tratados com os antibacterianos mencionados. Destacou-se que a produção de biomassa e atividade metabólica pelos biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231 tratados com os antibacterianos é substancialmente aumentada em todos os momentos de formação dos biofilmes, nas etapas de adesão, formação e maturação. Além disso, os tratamentos também induzem um aumento na quantidade de células viáveis durante a formação e maturação dos biofilmes.

Em estudo realizado por Vogel et al., (2013) foi evidenciado que o antibacteriano rifampicina aumenta a produção de determinantes de virulência e a formação de biofilme por *C. albicans*. Além disso, rifampicina também induz uma maior atividade metabólica celular, e proporciona o surgimento do fenótipo de hidrofobicidade da superfície celular. Ainda, promove uma maior ligação com fibronectina e estimula a formação do tubo germinativo. O fenótipo de hidrofobicidade da superfície celular propicia um aumento da ligação das células aos tecidos e materiais inanimados como cateteres, sendo assim um pré-requisito para a formação de biofilmes. Já a ligação à fibronectina tem sido considerada como uma

propriedade de virulência que permite a adesão ao tecido pela ligação da matriz extracelular, promovendo assim a iniciação e a disseminação da candidíase. Todos esses fatores, estão diretamente relacionados com a virulência de *C. albicans* (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015). Dessa maneira, biofilmes com maior quantidade de biomassa e com mais células viáveis e metabolicamente ativas aumenta as chances de cronicidade da doença e complicações clínicas relacionadas.

Destacou-se que os biofilmes produzidos por *C. albicans* ATCC 10231 são constituídos por células pleomórficas diferenciadas em blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas verdadeiras alongadas, recobertas por matriz exopolimérica e estão dispostas em multicamadas celulares. Apesar de não terem sido observadas diferenças morfológicas significativas nos tratamentos ao se analisar os biofilmes por microscopia eletrônica de varredura, cabe ressaltar que a capacidade de diferenciação morfológica de *C. albicans* desempenha um papel importante na maturação do biofilme, permitindo a formação de biofilmes mais robustos com maior número de hifas quando comparado à quantidade de blastoconídeos (VOGEL et al., 2013). Blastoconídeos e hifas verdadeiras podem ser comumente encontrados durante infecções sistêmicas e ambos os perfis celulares desempenham papéis distintos durante diferentes etapas da infecção. Os blastoconídeos são importantes para a disseminação fúngica por meio da corrente sanguínea, ao passo que a formação das hifas está associada à invasão tecidual do hospedeiro (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).

Evidenciou-se também que os biofilmes produzidos por *C. albicans* ATCC 10231 são compostos por quase que exclusivamente células viáveis. Embora os tratamentos tenham diminuído o biovolume e a espessura dos biofilmes no momento de adesão celular, provavelmente em decorrência de adaptação diante das drogas, a formação e a maturação dos biofilmes foram intensificadas pelo tratamento com os antibacterianos, acarretando no desenvolvimento de biofilmes mais espessos e volumosos, conferindo maior robustez. A complexa arquitetura dos biofilmes de *C. albicans* confere resistência intrínseca a uma grande variedade de tensões exercidas pelo organismo do hospedeiro, sobretudo aos mecanismos imunológicos de defesa, *stress* mecânico, e ainda, resistência aos antifúngicos, repercutindo por muitas vezes em insucesso terapêutico e complicações clínicas (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).

Os biofilmes produzidos tiveram ainda um aumento substancial da atividade proteolítica quando tratados com amoxicilina. Esses achados são corroborados pelos

resultados evidenciados nos testes com células planctônicas de *C. albicans* ATCC 10231. Como já mencionado, o aumento da atividade proteolítica de *C. albicans* é fator fundamental para o crescimento celular, favorece a adesão e penetração das células de *Candida* em tecidos do hospedeiro, acarretando no estabelecimento da infecção (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).

Investigou-se, ainda, o efeito dos antibacterianos sobre a quantidade de carboidratos e proteínas dos biofilmes produzidos por *C. albicans* ATCC 10231. Evidenciou-se que amoxicilina aumenta a quantidade de carboidratos, provavelmente quitina e 1,3- $\beta$ -glucanos, presentes no biofilme de *C. albicans*, sem alterar a quantidade de proteínas como um todo. De maneira geral, a matriz exopolimérica dos biofilmes fúngicos é constituída por proteínas, carboidratos da parede celular, lipídios, hexosamina, fósforo, ácido urânico e DNA extracelular (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015; ZARNOWSKI et al., 2014). Zarnowski et al., (2014) analisaram a composição *in vitro* e *in vivo* da matriz de biofilmes de *C. albicans* e os resultados revelaram que proteínas, cerca de 55%, são um dos principais componentes da matriz do biofilme, seguido de 25% de carboidratos, 15% de lipídios e 5% de ácido nucleico. Os autores detectaram um total de 565 proteínas diferentes associadas à matriz do biofilme de *C. albicans*, as quais são responsáveis por cerca de 458 funções diversas, supostamente envolvidas com 16 vias metabólicas distintas. Esses componentes proteicos são considerados fatores envolvidos no metabolismo de carboidratos e aminoácidos, sugerindo que a matriz do biofilme também pode funcionar como um “sistema digestivo externo”, que aumenta a captação de nutrientes como fontes de energia para as células associadas em biofilme. Alterações na constituição química da matriz exopolimérica dos biofilmes pode acarretar diretamente na virulência fúngica e/ou resistência aos antifúngicos. Compreender os mecanismos envolvidos na síntese da matriz dos biofilmes é o ponto chave para o desenvolvimento de estratégias antifúngicas.

Nesse contexto, o próximo passo foi investigar a influência de cefepime e amoxicilina na composição bioquímica da matriz dos biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231. Destacou-se que amoxicilina induz a síntese de uma chaperona de choque térmico de 70 Da denominada de Hsp70 (*heat shock protein 70*). As proteínas de choque térmico são chaperonas altamente conservadas em eucariotos e procariotos, participando de diversas vias metabólicas celulares. Sua principal função é auxiliar outras proteínas a manter sua conformação tridimensional, permanecendo ativas. Existem diversas classes de proteínas de choque térmico que são classificadas mediante seu peso molecular. Em *C. albicans* já foram descritos seis tipos de

Hsp (Hsp104, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp21 e Hsp12) sendo Hsp90 e Hsp70 as principais estudadas em patógenos fúngicos. Evidências científicas têm demonstrado que as proteínas Hsp são necessárias para a morfogênese, transição micélio-levedura, conidiogênese, integridade da parede celular, sinalização celular e resistência a antifúngicos em diversos fungos. Já foi constatado que em *C. albicans*, as proteínas Hsp potencializam uma rápida evolução da resistência aos antifúngicos, sobretudo aos azólicos e equinocandinas, em células planctônicas e, também participam na dispersão e resistência aos antifúngicos em biofilme (GONG et al., 2017).

Por fim, investigou-se o efeito de cefepime e amoxicilina em um dos fenômenos mais característicos dos biofilmes, a resistência aos antifúngicos. Destacou-se que amoxicilina aumenta a tolerância dos biofilmes à caspofungina. Os principais carboidratos produzidos por *C. albicans* são 1,3- $\beta$ -glucano e quitina, responsáveis pela estruturação da parede celular do fungo. O aumento na produção de carboidratos, especialmente 1,3- $\beta$ -glucano e quitina, pode ter um impacto direto na resistência às equinocandinas, como à caspofungina. Um estudo conduzido por Lee et al., (2012) revelou que a alta quantidade de quitina na parede celular de *C. albicans* confere resistência *in vivo* à caspofungina. Além disso, Lamoth et al., (2015) revelaram que a tolerância à caspofungina em *Aspergillus fumigatus* é mediada por Hsp70. Dessa forma, é possível que o uso de amoxicilina no tratamento de infecções sistêmicas em pacientes de risco possa resultar em dificuldade de tratamento se a infecção for decorrente do estabelecimento de biofilme por *C. albicans*.

Nesse contexto, o presente estudo destacou que antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e vancomicina estimulam o crescimento planctônico e a atividade proteolítica, sem modificar a atividade fosfolipídica de *Candida* spp. Ademais, amoxicilina potencializa a virulência de *C. krusei* e *C. tropicalis* em modelo de infecção experimental utilizando *Caenorhabditis elegans*. Ainda, extratos de biofilme de *E. coli* tratados com amoxicilina ou cefepime, de maneira geral, não interferem na produção de biofilme de *C. albicans*, quando comparados aos antibacterianos testados isoladamente. Ademais, amoxicilina e cefepime intensificam a produção de biofilme por *C. albicans* decorrente do aumento da produção de biomassa, atividade metabólica, contagem de células viáveis, biovolume, espessura, atividade proteolítica e quantificação de carboidratos dos biofilmes produzidos. Ainda, amoxicilina induz a síntese de Hsp70 pelo biofilme de *C. albicans*. Por fim, amoxicilina proporciona maior tolerância dos biofilmes de *C. albicans* à caspofungina. Esses achados podem ter impacto direto na fisiopatologia das infecções fúngicas invasivas em pacientes em risco.



## 7 CONCLUSÃO

1. Antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e vancomicina estimulam o crescimento planctônico de *Candida* spp.;
2. Vancomicina diante *C. parapsilosis* e amoxicilina em face de *C. tropicalis* alteraram o perfil populacional celular, aumentando o volume celular;
3. Antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e vancomicina aumentam a atividade proteolítica, mas não modificam a atividade fosfolipídica de *Candida* spp.;
4. Amoxicilina potencializa a virulência *in vivo* de *C. krusei* e *C. tropicalis* em modelo de infecção experimental utilizando *Caenorhabditis elegans*;
5. Extratos de biofilme de *E. coli* tratados com amoxicilina ou cefepime, de maneira geral, não interferem na produção de biofilme de *C. albicans*, quando comparados aos antibacterianos testados isoladamente, aumentando apenas a atividade proteolítica dos biofilmes de *C. albicans*;
6. Amoxicilina e cefepime intensificam a produção de biofilme decorrente da produção de biomassa, atividade metabólica, células viáveis, biovolume, espessura e atividade proteolítica por *C. albicans*; e
7. Amoxicilina aumenta a quantificação de carboidratos, induz a síntese de Hsp70 e resulta em maior tolerância do biofilme de *C. albicans* à caspofungina.

## REFERÊNCIAS

ALANGADEN, G. J. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. **Infectious Disease Clinics**, v. 25, n. 1, p. 201-225, 2011.

ANDRADE-NETO, J. B.; SILVA, C. R.; NETA, M., A. S.; CAMPOS, R. S.; SIEBRA, J. T.; SILVA, R. A. C.; GASPAR, D. M.; MAGALHÃES, H. I. F.; MORAES, M. O.; LOBO, M. D. P.; GRANGEIRO, T. B.; CARVALHO, T. S. C.; DIOGO, E. T.; SILVA-JÚNIOR, E. N.; RODRIGUES, F. A. R.; CAVALCANTI, B. C.; NOBRE-JÚNIOR, H. V. Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds *in vitro* against fluconazole-resistant strains of different *Candida* species: a special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis*. **PLoS One**, v. 9, n. 5, 2014.

ANNE-MARIE, L.; JOHNSON, J. R.; DUNNY, G. M. A widely used *in vitro* biofilm assay has questionable clinical significance for enterococcal endocarditis. **PLoS One**, v. 9, n. 9, 2014.

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. **Yeast**, v. 25, p. 385-417, 2004.

BAYRAMOGLU, G.; SONMEZ, M.; TOSUN, I.; AYDIN, K.; AYDIN, F. Breakthrough *Trichosporon asahii* fungemia in neutropenic patient with acute leukemia while receiving caspofungin. **Infection**, v. 36, n. 1, p. 68-70, 2008.

BAZZINI, S.; UDINE, C.; SASS, A.; PASCA, M. R.; LONGO, F.; EMILIANI, G.; FONDI, M.; PERRIN, E.; DECOROSI, F.; VITI, C.; GIOVANNETTI, L.; LEONI, L.; FANI, R.; RICCARDI, G.; MAHENTHIRALINGAM, E.; BURONI, S. Deciphering the role of RND efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia*. **PLoS One**, v. 6, n. 4, 2011.

BIEMANN, K. Mass spectrometry of peptides and proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 61, p. 977-1010, 1992.

BIZERRA, F. C.; NAKAMURA, C. V.; POERSCH, C.; ESTIVALET, S. T. I.; BORSATO, Q. R. M.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A.; YAMADA-OGATTA, S. F. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 442-450, 2008.

BREGER, J.; FUCHS, B. B.; APERIS, G.; MOY, T. I.; AUSUBEL, F. M.; MYLONAKIS, E. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 2, p. 18, 2007.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. 28, 2018.

CHAGAS-NETO, T. C.; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A. L. Update on the genus *Trichosporon*. **Mycopathologia**, v. 166, n. 3, p. 121-132, 2008.

CHAI, L. Y. A.; DENNING, D. W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 282-298, 2010.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K. *Candida* biofilms: development, architecture, and resistance. **Microbiol Spectrum**, v. 3, n. 4, 2015.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501-505, 1947.

CLARK, H. L.; MINNS, M. S.; SUN, Y.; JESUS, T.; GHANNOUM, M. G.; PEARLMAN, E. Atovaquone impairs growth of *Aspergillus* and *Fusarium* keratitis isolates by modulating mitochondrial function and zinc homeostasis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 59, n. 3, p. 1589-1598, 2018.

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; Approved Standard – Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved Standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Pathology**, v. 9, p. 219-138, 2014.

COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. **Biotechniques**, v. 43, p. 25-30, 2007.

COLOMBO, A. L.; PADOVAN, A. C.; CHAVES, G. M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and trichosporonosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 682-700, 2011.

CORDEIRO, R. A.; EVANGELISTA, A. J. J.; SERPA, R.; MARQUES, F. J.; MELO, C. V.; OLIVEIRA, J. S.; FRANCO, J. S.; ALENCAR, L. P.; BANDEIRA, T. J. G.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. Inhibition of heat-shock protein 90 enhances the susceptibility to antifungals and reduces the virulence of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. **Microbiology**, v. 162, p. 309-317, 2015a.

CORDEIRO, R. A.; DE OLIVEIRA, J. S.; CASTELO-BRANCO, D. S.; TEIXEIRA, C. E.; MARQUES, F. J.; BITTENCOURT, P. V.; CARVALHO, V. L.; BANDEIRA, T. J.; BRILHANTE, R. S. *Candida tropicalis* isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors. **Medical Mycology**, v. 53, p. 145-152, 2015b.

CORDEIRO, R. A.; SERPA, R.; MENDES, P. B. L.; EVANGELISTA, A. J. J.; ANDRADE, A. R. C.; FRANCO, J. S.; PEREIRA, V. S.; ALENCAR, L. P.; OLIVEIRA, J. S.; CAMARGO, Z. P.; LIMA-NETO, R. G.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. The HIV aspartyl protease

inhibitor ritonavir impairs planktonic growth, biofilm formation and proteolytic activity in *Trichosporon* spp. **Biofouling**, v. 33, p. 640-650, 2017.

COSTA, T. O. G.; ALMEIDA, R. A.; MELO, J. T.; KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A.; LEITE, J. R. R. S. A.; PRATES, M. V.; BLOCH-JÚNIOR, C.; PINTO, A. C. Isolation and amino acid sequencing by MALDI-TOF-MS/MS of a novel antimicrobial anionic peptide from the skin secretion of *Osteocephalus taurinus* (Anura, Hylidae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 2133-2136, 2012.

COSTA-ORLANDI, C. B.; SARDI, J. C. O.; PITANGUI, N. S.; OLIVEIRA, H. C.; SCORZONI, L.; GALEANE, M. C.; MEDINA-ALARCÓN, K. P.; MELO, W. C. M. A.; MARCELINO, M. Y.; BRAZ, J. D.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, 2017.

CRÉMET, L.; CORVEC, S.; BATARD, E.; AUGER, M.; LOPEZ, I.; PAGNIEZ, F.; DAUVERGNE, S.; CAROFF, N. Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. **Diagnostic Microbiology & Infectious Diseases**, v. 75, p. 252-255, 2013.

DADAR, M.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; CHAKRABORTY, S.; SHAHALI, Y.; DHAMA, K. *Candida albicans* – Biology, molecular characterization, pathogenicity, and avances in diagnosis and control – An update. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, p. 128-138, 2018.

DANTAS, A. S.; LEE, K. K.; RAZIUNAITE, I.; SCHAEFER, K.; WAGENER, J.; YADAV, B.; GOW, N. A. R. Cell biology of *Candida albicans* – host interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 36, p. 111-118, 2016.

ESSER, K.; KURZAI, O. Human Fungal Pathogens. In: **The Mycota**. 2 ed. London: Springer, vol. 12, 2014. 298 p.

FÓRES, R.; RAMOS, A.; ORDEN, B.; LAIGLESIA, A.; BAUTISTA, G.; CABERO, M.; MUÑOZ, E.; SÁNCHEZ-ROMERO, I.; NAVARRO, B.; BRAVO, J.; CABRERA, R.

*Rhodotorula* species fungaemia causes low mortality in haematopoietic stem-cell transplantation. A case report and review. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 158-162, 2012.

FOURNIER, P.; SCHWEBEL, C.; MAUBON, D.; VESIN, A.; LEBEAU, B.; FORONI, L.; HAMIDFAR-ROY, R.; CORNET, M.; TIMSIT, J. F.; PELLOUX, H. Antifungal use influences *Candida* species distribution and susceptibility in the intensive care unit. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 12, p. 2880-2886, 2011.

GIRMENIA, C.; PAGANO, L.; MARTINO, B.; D'ANTONIO, D.; FANCI, R.; SPECCHIA, G.; MELILLO, L.; BUELLI, M.; PIZZARELLI, G.; VENDITTI, M.; MARTINO, P. Infection Program. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1818-1828, 2005.

GONG, Y.; LI, T.; YU, C.; SUN, S. *Candida albicans* heat shock proteins and hsp-associated signaling pathways as potential antifungal targets. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 520, 2017.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 12<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2012. 2112 p.

GUSTINETTI G.; MIKULSKA, M. Bloodstream infections in neutropenic cancer patients: a practical update. **Virulence**, n. 7, p. 280-297, 2016.

HAHN-AST, C.; GLASMACHER, A.; MÜCKTER, S.; SCHMITZ, A.; KRAEMER, A.; MARKLEIN, G.; BROSSART, P.; VON LILIENFELD-TOAL, M. Overall survival and fungal infection-related mortality in patients with invasive fungal infection and neutropenia after myelosuppressive chemotherapy in tertiary care centre from 1995 to 2006. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 761-768, 2010.

HORN, D. L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E. J.; FISHMAN, J. A.; STEINBACH, W. J.; OLYAEI, A. J.; MARR, K. A.; PFALLER, M. A.; CHANG, C. H.; WEBSTER, K. M.

Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 12, p. 1695-1703, 2009.

JAFARI, M.; SALARI, S.; PAKSHIR, K.; ZOMORODIAN, K. Exoenzyme activity and possibility identification of *Candida dubliniensis* among *Candida albicans* species isolated from vaginal candidiasis. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 73-77, 2017.

JAYATILAKE, J. A. M. S.; SAMARANAYAKE, L. P. Experimental superficial candidiasis on tissue models. **Mycoses**, v. 53, p. 285-295, 2010.

JAYATILAKE, J. A. M. S.; TILAKARATNE, W. M.; PANAGODA, G. J. Candidal onychomycosis: a mini-review. **Mycopathologia**, v. 168, p. 165-173, 2009.

KABIR, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AHMAD, Z. *Candida albicans*: a model organism for studying fungal pathogens. **ISRN Microbiology**, v. 2012, 2012.

KAGAN, S.; JABBOUR, A.; SIONOV, E.; ALQUNTAR, A. A.; STEINBERG, D.; SREBNIK, M.; NIR-PAZ, R.; WEISS, A.; POLACHECK, I. Anti-*Candida albicans* biofilm effect of novel heterocyclic compounds. **The Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 416-427, 2014.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**. vol. 46, p. 120-128, 2008.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 211–224, 2009.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE, A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P.; MUKTA, M. S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678-5698, 2012.

KIM, H. A.; HYUN, M.; RYU, S. Y. Catheter-associated *Rhodotorula mucilaginosa* fungemia in an immunocompetent host. **Infection Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 339-342, 2013.

KRUPPA, M. Quorum sensing and *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 52, n. 1, p. 1-10, 2009.

LAMOTH, F.; JUVVADI, P. R.; SODERBOLM, E. J.; MOSELEY, M. A.; STEINBACH, W. J. Hsp70 and the cochaperone StiA (Hop) orchestrate Hsp90-mediated caspofungin tolerance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4727-4733, 2015.

LASS-FLÖRL, C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. **Mycoses**, v. 52, n. 3, p. 197-205, 2009.

LEE, K. K.; MACCALLUM, D. M.; JACOBSEN, M. D.; WALKER, L. A.; ODDS, F. C.; GOW, N. A.; MUNRO, C. A. Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance *in vivo*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 208-217, 2012.

LÉONARD, L.; BOUARAB, C. L.; OULED B. B.; DEGRAEVE, P.; OULAHAL, N. Recent advances on multi-parameter flow cytometry to characterize antimicrobial treatments. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1225, 2017.

LIONAKIS, M. S.; NETEA, M. G. *Candida* and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, 2013.

LYNCH, A. S.; ROBERTSON, G. T. Bacterial and fungal biofilm infections. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 415-428, 2008.

MARIETTE, C.; TAVERNIER, E.; HOCQUET, D.; HUYNH, A.; ISNARD, F.; LEGRAND, F.; LHÉRITIER, V.; RAFFOUX, E.; DOMBRET, H.; IFRAH, N.; CAHN, J. Y.; THIÉBAUT, A. Epidemiology of invasive fungal infections during induction therapy in



adults with acute lymphoblastic leukemia: a GRAALL-2005 study, **Leukemia & Lymphoma**, v. 58, n. 3, 2017.

MATTHAIYOU, D. K.; CHRISTODOULOPOULOU, T.; DIMOLOPOULOS, G. How to treat fungal infections in ICU patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, p. 250, 2015.

MATSUE, K.; URYU, H.; KOSEKI, M.; ASADA, N.; TAKEUCHI, M. Breakthrough trichosporonosis in patients with hematologic malignancies receiving micafungin. **Clinical Infectious Disease**, v. 42, n. 6, p. 753-757, 2006.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MELLO, T. P.; RAMOS, L. S.; BRAGA-SILVA, L. A.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S. Fungal biofilm – a real obstacle against an efficient therapy: lessons from *Candida*. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 1-18, 2017.

MERSEGUEL, K. B.; NISHIKAKU, A. S.; RODRIGUES, A. M.; PADOVAN, A. C.; FERREIRA, R. C.; AZEVEDO, M. A. S.; BRIONES, M. R.; COLOMBO, A. L. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 57, p. 1-11, 2015.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142-51, 2011.

MIMICA, L. M. J.; UEDA, S. M. Y.; MARTINO, M. D. V.; NAVARINI, A.; MARTINI, I. J. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 1, p. 17-23, 2009.

MOHAMMED, M. M. A.; NERLAND, A. H.; AL-HARONI, M.; BAKKEN, V. Characterization of extracellular polymeric matrix, and treatment of *Fusobacterium*

*nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* biofilms with DNase I and proteinase K. **Journal of Oral Microbiology**, v. 5, 2013.

MORETTI-BRANCHINI, M. L.; FUKUSHIMA, K.; SCHREIBER, A. Z.; NISHIMURA, K.; PAPAORDANOU, P. M.; TRABASSO, P.; TANAKA, R.; MIYAJI, M. *Trichosporon* species infection in bone marrow transplanted patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 161-164, 2001.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 8<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. 848 p.

MUSKETT, H.; SHAHIN, J.; EYRES, G.; HARVEY, S.; ROWAN, K.; HARRISON, D. Risk factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: a systematic review. **Critical Care**, v. 15, n. 6, 2011.

NAGLIK, J. R.; KONIG, A.; HUBE, B.; GAFFEN, S. L. *Candida albicans* – epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 40, p. 104-112, 2017.

NEGRI, M. F.; FARIA, M. G.; GUILHERMETTI, E.; ALVES, A. A.; PAULA, C. R.; SVIDZINSKI, T. I. E. Hemolytic activity and production of germ tubes related to pathogenic potential of clinical isolates of *Candida albicans*. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 1, p. 89-93, 2010.

NIEDERMEYER, T. H. J.; STROHALM, M. mMass as a software tool for the annotation of cyclic peptide tandem mass spectra. **PLoS One**, v. 7, n. 9, 2012.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I. N.; CORTES, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAYA, M. E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; ECHEVARRIA, J. I.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

PAPON, N.; COURDAVAULT, V.; CLASTRE, M.; BENNETT, R. J. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm, **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 9, 2013.

PAPPAS, P. G.; ANDES, D.; SCHUSTER, M.; HADLEY, S.; RABKIN, J.; MERION, R. M.; KAUFFMAN, C. A.; HUCKABEE, C.; CLOUD, G. A.; DISMUKES, W. E.; KARCHMER, A. W. Invasive fungal infections in low-risk liver transplant recipients: a multi-center prospective observational study. **American Journal Transplantation**, v. 6, n. 2, p. 386-391, 2006.

PAPPAS P. G.; LIONAKIS, M. S.; ARENDRUP, M. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG, B. J. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 11, n. 4, 2018.

PARK, B. J.; WANNEMUEHLER, K. A.; MARSTON, B. J.; GOVENDER, N.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-530, 2009.

PARKER, J. E.; ANDREW, G. S.; WARRILOW, C. L.; PRICE, J.; MULLINS, G. L.; DIANE, E. K.; STEVEN, L. K. Resistance to antifungals that target CYP51. **Journal of Chemical Biology**, v. 7, n. 4, p. 143-161, 2014.

PEREIRA, T. C. D.; BARROS, R. A. M. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*: perspectivas sobre a eco-epidemiologia e novos nichos ecológicos. **FACIDER**, v. 1, n. 1, 2012.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Medical Mycology**, v. 45, n. 4, p. 321-346, 2007.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p. 3-13, 2012.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V.A.; MEIS, J. F.; GOULD, I. M.; FU, W.; COLOMBO, A.L.; RODRIGUEZ-NORIEGA, E. GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE STUDY. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1735-1745, 2007.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. *Candida* survival strategies. **Advances in Applied Microbiology**, v. 91, p. 139-235, 2015.

PUKKILA-WORLEY, R.; AUSUBEL, F. M.; MYLONAKIS, E. *Candida albicans* infection of *Caenorhabditis elegans* induces antifungal immune defenses. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 6, 2011.

RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C.; LOPEZ-RIBOT, J. Our current understanding of fungal biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 340-355, 2009.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilms resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

RICHARDSON, M.; LASS-FLÖRL, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, sup 14, p. 5-24, 2008.

ROGERS, H.; WILLIAMS, D. W.; FENG, G. J.; LEWIS, M. A.; WEI, X. Q. Role of bacterial lipopolysaccharide in enhancing host immune response to *Candida albicans*. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, 2013.

ROMAN, A. D.; SALVAÑA, E. M.; GUZMAN-PEÑAMORA, M. A.; ROXAS, E. A.; LEYRITANA, K. T.; SANIEL, M. C. Invasive trichosporonosis in an AIDS patient: case report and review of the literature. **International Journal of STD & AIDS**, v. 25, n. 1, p. 70-75, 2014.

SAMONIS, G.; GALANAKIS, E.; NTAOUKAKIS, M.; SARCHIANAKI, E.; SPATHOPOULOU, T.; DIMIPOULOU, D.; KOFTERIDIS, D. P.; MARAKI, S. Effects of carbapenems and their combination with amikacin on murine gut colonisation by *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 56, n. 2, p. 105-109, 2013.

SAMONIS, G.; MARAKI, S.; BARBOUNAKIS, E.; LEVENTAKOS, K.; LAMARIS, G.; ROVITHI, M.; HATJIOANNOU, I.; POTOLIDIS, E.; TSELENTIS, Y.; MANTADAKIS, E. Effects of vancomycin, teicoplanin, linezolid, quinupristin-dalfopristin, and telithromycin on murine gut colonization by *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 44, n. 2, p. 193-196, 2006a.

SAMONIS, G.; MARAKI, S.; LEVENTAKOS, K.; SPANAKI, A. M.; KETEIFIDIS, A.; GALANAKIS, E.; TSELENTIS, Y.; FALAGAS, M. E.; MANTADAKIS, E. Comparative effects of ertapenem, imipenem, and meropenem on the colonization of the gastrointestinal tract of mice by *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 44, p. 233-235, 2006b.

SANTOS-JÚNIOR, I. D.; SOUZA, I. A. M.; BORGES, R. G.; SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, v. 15, p. 189-197, 2005.

SCHULZE, J.; SONNENBORN, U. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents, **Deutsches Arzteblatt International**, v. 106, n. 51, p. 837-842, 2009.

SELLAM, A.; WHITEWAY, M. Recent advances on *Candida albicans* biology and virulence. **F1000Research**, v. 26, n. 5, p. 2582-2598, 2016.

SHIRKHANI, S.; SEPAHVAND, A.; MIRZAEI, M.; ANBARI, K. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* spp. isolates from vulvovaginitis in Iran. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 26, n. 3, p. 255-260, 2016.

SILVA, A. R.; ANDRADE-NETO, J. B.; SILVA, C. R.; CAMPOS, R. S.; COSTA, S. R. A.; FREITAS, D. D.; NASCIMENTO, F. B.; ANDRADE, L. N.; SAMPAIO, L. S.; GRANGEIRO, T. B.; MAGALHÃES, H. I.; CAVALCANTI, B. C.; MORAES, M.

O.; NOBRE-JÚNIOR, H. V. Berberine antifungal activity in fluconazole-resistant pathogenic yeasts: action mechanism evaluated by flow cytometry and biofilm growth inhibition in *Candida* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3551-3557, 2016.

SIPSAS, N. V.; LEWIS, R. E.; TARRAND, J.; HACHEM, R.; ROLSTON, K. V.; RAAD, I. I.; KONTOYIANNIS, D. P. Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001-2007). **Cancer**, v. 115, n. 20, p. 4745-4752, 2009.

SPILIOPOULOU, A.; ANASTASSIOU, E. D.; CHRISTOFIDOU, M. *Rhodotorula* fungemia of an intensive care unit patient and review of published cases. **Mycopathologia**, v. 174, n. 4, p. 301-309, 2012.

SPITZER, M.; ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections, **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 169-185, 2017.

SUZUKI, K.; NAKASE, K.; KYO, T.; KOHARA, T.; SUGAWARA, Y.; SHIBAZAKI, T.; OKA, K.; TSUKADA, T.; KATAYAMA, N. Fatal *Trichosporon* fungemia in patients with hematologic malignancies. **European Journal of Haematology**, n. 84, v. 5, p. 441-447, 2010.

TSAI, C. C.; LAY, C. J.; WANG, C. L.; LIN, M. L.; YANG, S. P. Prognostic factors of candidemia among non-neutropenic adults with total parenteral nutrition. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 44, n. 6, p. 461-466, 2011.

TUON, F. F.; COSTA, S. F. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 3, p. 135-140, 2008.

VAUDEL, M.; BARSNES, H.; BERVEN, F. S.; SICKMANN, A.; MARTENS, L. SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X!Tandem searches. **Proteomics**, v. 11, n. 5, p. 996-999, 2011.

VOGEL, M.; KÖBERLE, M.; SCHÄFFLER, H.; TREIBER, M.; AUTENRIETH, I. B. Rifampicin induced virulence determinants increase *Candida albicans* biofilm formation. **F1000 Research**, v. 2, n. 106, 2013.

WALSH, T. J.; GROLL, A.; HIEMENZ, J.; FLEMING, R.; ROILIDES, E.; ANAISSIE, E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 1, p. 44-66, 2004.

WATAMOTO, T.; SAMARANAYAKE L. P.; EGUSA, H.; YATANI, H.; SENEVIRATNE, C. J. Transcriptional regulation of drug-resistance genes in *Candida albicans* biofilms in response to antifungals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 1241-1247, 2011.

XIE, J. L.; ELIZABETH, J.; POLVI, T.; SHEKHAR-GUTURJA, T.; COWEN, L. E. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future Microbiology**. vol. 9, n. 4, p. 523-542, 2014.

ZARNOWSKI, R.; WESTLER, W. M.; LACMBOUH, G. A.; MARITA, J. M.; BOTHE, J. R.; BERNHARDT, J.; SAHRAOUI, A. L.; FONTAINE, J.; SANCHEZ, H.; HATFIELD, R. D.; NTAMBI, J. M.; NETT, J. E.; MITCHELL, A. P.; ANDESA, D. R. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. **MBio**, v. 5, n. 4, 2014.

## APÊNDICES

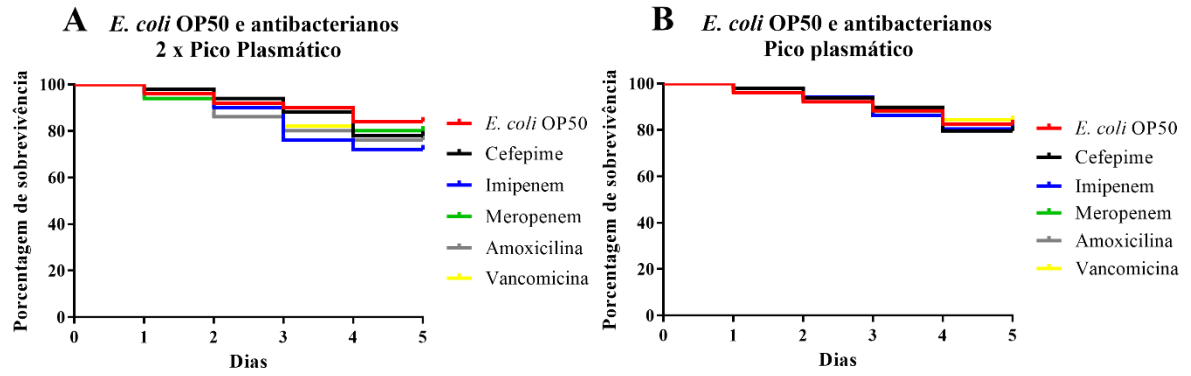
### Apêndice A – *Breakpoints* de leitura dos antibacterianos em face de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

CIM - Antibacterianos	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>S. aureus</i> ATCC 25923		
	S	SDD	R	S	SDD	R
<i>Breakpoints</i> *						
Cefepime	≤ 2	4 - 8	≥ 16	-	-	-
Imipenem	≤ 1	2	≥ 4	-	-	-
Meropenem	≤ 1	2	≥ 4	-	-	-
Amoxicilina	≤ 8	16	≥ 32	-	-	-
Vancomicina	-	-	-	≤ 2	4 - 8	≥ 16

**Legenda:** CIM = Concentração Inibitória Mínima; S = Sensível; R = Resistente; SDD = Sensível Dose Dependente \* Fonte: Manual M100-S24 (CLSI, 2014).

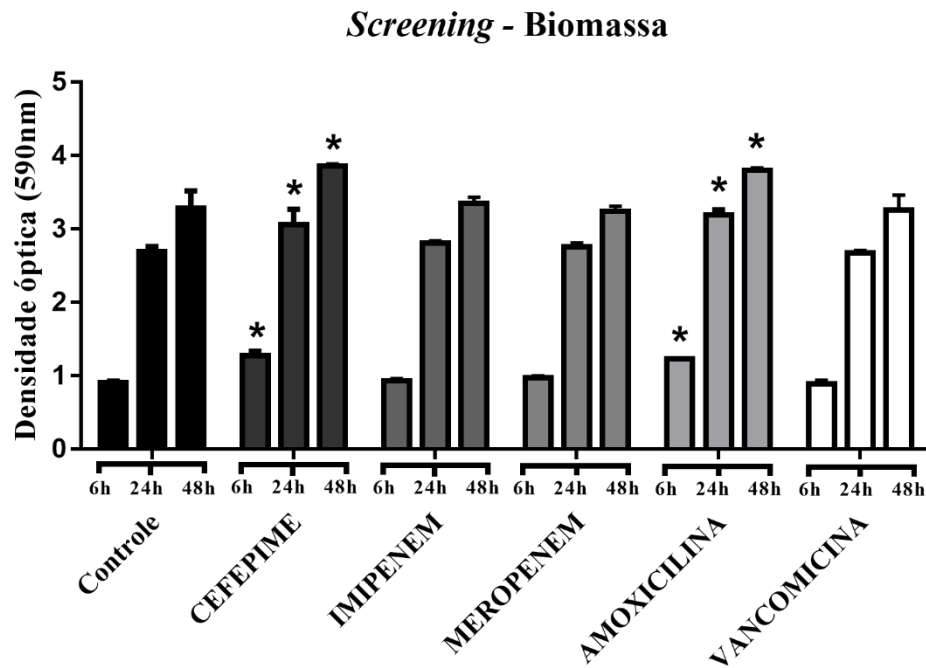


**Apêndice B – Controle de toxicidade dos antibacterianos e *Escherichia coli* OP50 diante *Caenorhabditis elegans***



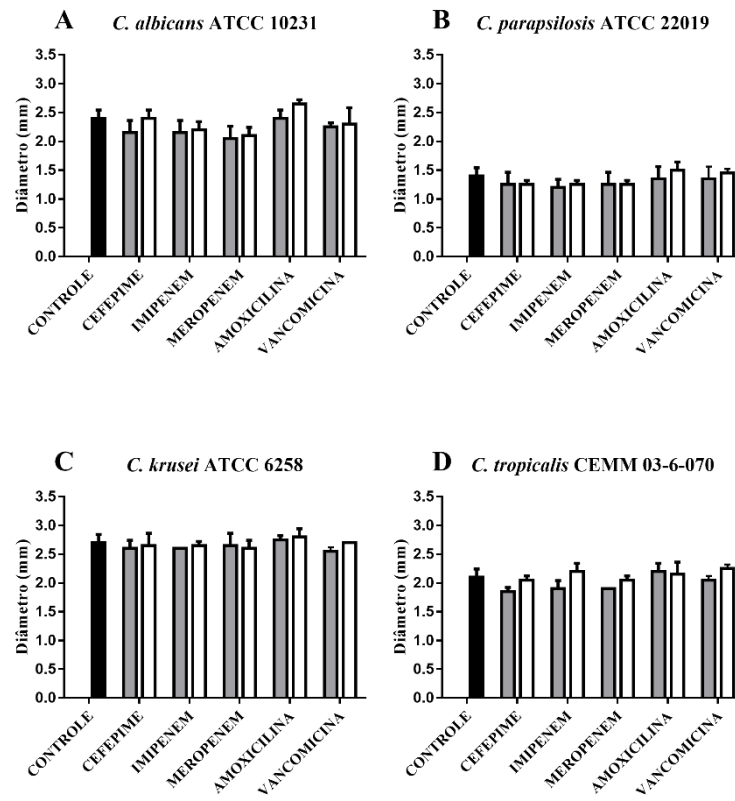
**Legenda:** (A) Concentração de duas vezes o pico plasmático; (B) Concentração de pico plasmático.

Apêndice C – *Screening* da produção de biomassa do biofilme de *Candida albicans* em face dos antibacterianos



**Legenda:** Cada grupo de barras contém as análises de 6, 24 e 48 h, respectivamente. \* = diferença estatística comparada ao respectivo controle ( $p < 0,05$ ).

**Apêndice D – Efeito dos antibacterianos em face da atividade fosfolipídica de *Candida* spp.**



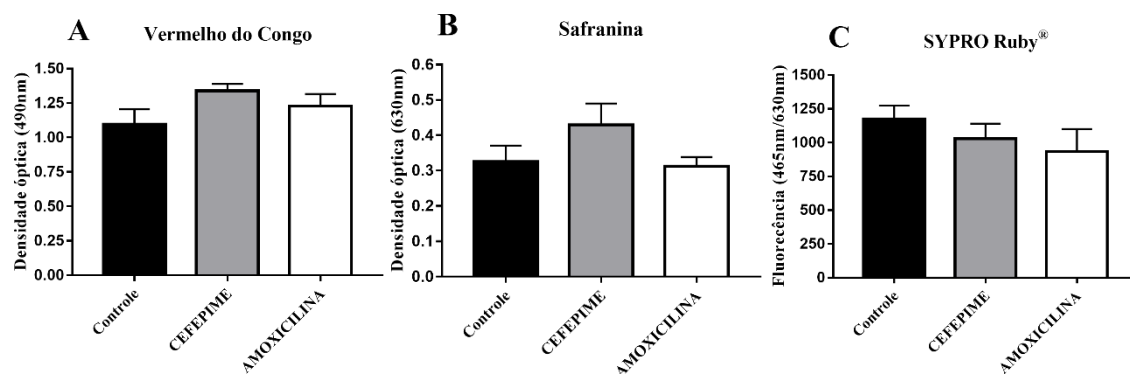
**Legenda:** (A) *C. albicans* ATCC 10231 (B); *C. parapsilosis* ATCC 22019; (C) *C. krusei* ATCC 6258; (D) *C. tropicalis* CEMM 03-6-070. Barras pretas: controle sem tratamento. Barras cinza: 2 x pico plasmático de cada antibacteriano testado. Barras brancas: pico plasmático de cada antibacteriano testado.

**Apêndice E – Efeito dos antibacterianos em face da virulência *in vivo* de *Candida* spp. em modelo de infecção experimental utilizando *Caenorhabditis elegans***

Espécies	Concentrações	Dias	Controle	CEF	IMIP	MER	AMOX	VANCO
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	2 x pico plasmático	0	100	100	100	100	100	100
		1	88	86	88	87,75	86	85,71
		2	52	48	54	53,06	48	51,02
		3	18	12	18	18,36	10	14,28
		4	4	0	4	4,08	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	
	pico plasmático	0	100	100	100	100	100	100
		1	90	90,19	92	92	90	90
		2	56	49,01	56	56	48	54
		3	26	19,60	26	26	18	24
4		4	0	4	4	0	2	
5	0	0	0	0	0	0		
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	2 x pico plasmático	0	100	100	100	100	100	100
		1	94	92,15	96,07	96,07	92,15	92,15
		2	66	58,82	70,58	70,58	58,82	64,70
		3	26	15,68	29,41	29,41	11,76	21,56
		4	4	0	7,84	7,84	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	
	pico plasmático	0	100	100	100	100	100	100
		1	94	94,11	96	95,91	94,23	93,87
		2	66	60,78	68	71,42	59,61	67,34
		3	32	23,52	36	38,77	19,23	30,61
4		10	1,960	14	16,32	0	8,16	
5	0	0	0	0	0	0		
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	2 x pico plasmático	0	100	100	100	100	100	100
		1	84	80	83,67	85,71	80	84
		2	46	36	46,93	44,89	34	44
		3	30	16	28,57	28,57	12*	26
		4	10	0	8,16	8,16	0	6
	5	0	0	0	0	0	0	
	pico plasmático	0	100	100	100	100	100	100
		1	84	86,27	90	90	79,59	86,27
		2	46	41,17	52	52	34,69	47,05
		3	30	15,68	30	30	12,24*	25,49
4		10	0	10	10	0	5,88	
5	0	0	0	0	0	0		
<i>C. tropicalis</i> CEMM 03-6-070	2 x pico plasmático	0	100	100	100	100	100	100
		1	92	88	91,83	91,83	86,27	88
		2	58	50	59,18	57,14	47,05	54
		3	36	24	38,77	34,69	21,56*	32
		4	12	0	14,28	10,20	0	8
	5	0	0	0	0	0	0	
	pico plasmático	0	100	100	100	100	100	100
		1	92	92,15	94	94	86	94
		2	58	56,86	62	62	48	62
		3	36	31,37	40	40	22*	38
4		12	3,92	10	10	0	8	
5	0	0	0	0	0	0		

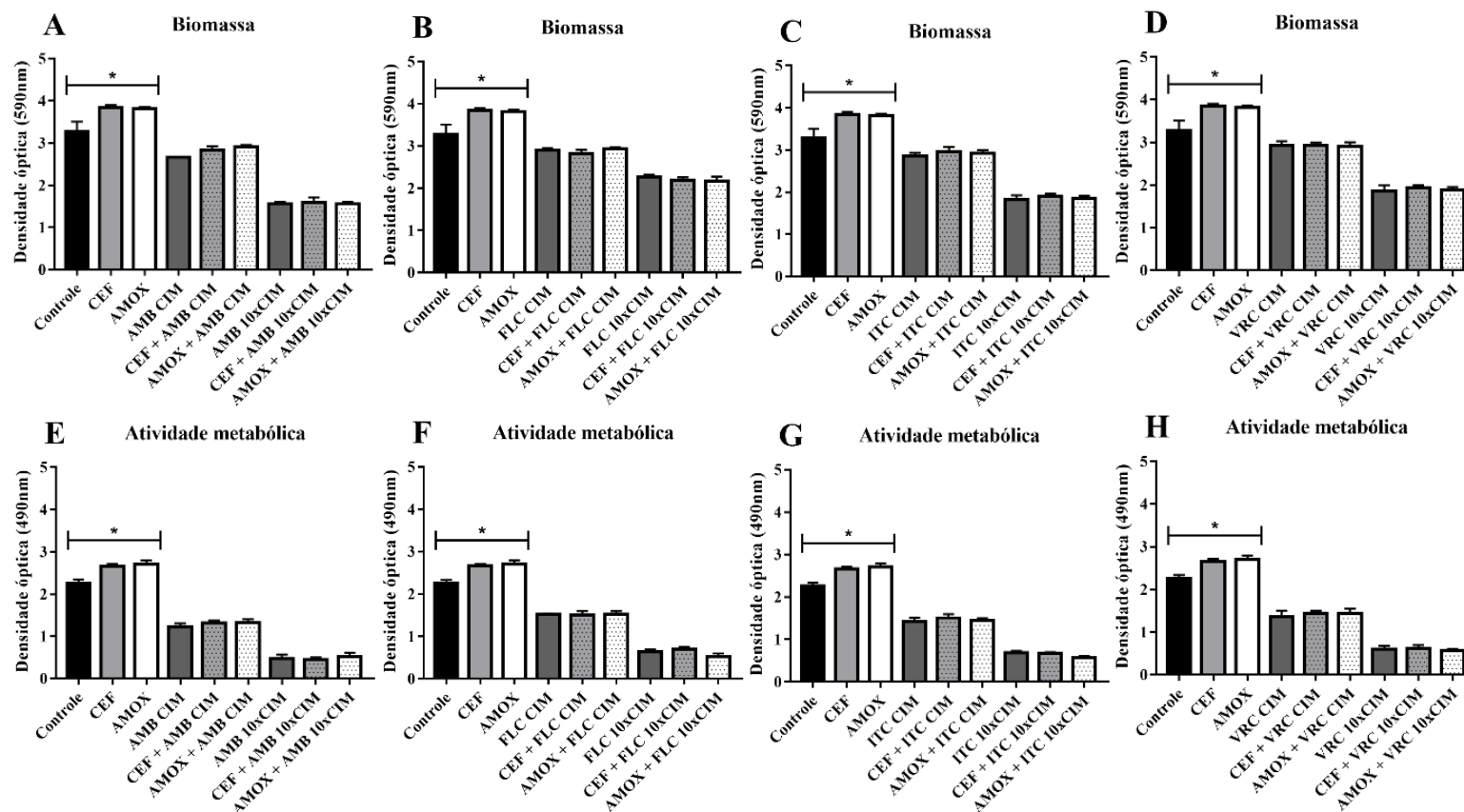
**Legenda:** CEF = Cefepime; IMIP = Imipenem; MER = Meropenem; AMOX = Amoxicilina e; VANCO = Vancomicina. Resultados expressos em porcentagem. \* = Diferença estatística em relação ao controle.

**Apêndice F – Efeito dos antibacterianos em face da quantificação de carboidratos e proteínas do biofilme de *Candida albicans* usando vermelho do Congo, safranina e SYPRO® Ruby**



**Legenda:** (A) Vermelho do Congo; (B) Safranina; (C) SYPRO® Ruby. Barras pretas: controles. Barras cinzas claras: tratamento com cefepime. Barras brancas: tratamento com amoxicilina.

### Apêndice G – Efeito de cefepime e amoxicilina em face da tolerância do biofilme de *Candida albicans* ATCC 10231 aos antifúngicos



**Legenda:** Efeito de cefepime e amoxicilina em face da tolerância do biofilme produzido por *Candida albicans* ATCC 10231 aos antifúngicos. (A-E) Biomassa; (F-H) atividade metabólica; CEF = cefepime; AMOX = amoxicilina; AMB = anfotericina B; FLC = fluconazol; ITC = itraconazol; VRC = voriconazol; CIM = concentração inibitória mínima; Barras pretas: controles. Barras cinzas claras: tratamento com cefepime. Barras brancas: tratamento com amoxicilina. Barras cinzas escuras: tratamento apenas com caspofungina. Barras pontilhadas: tratamento com antibacterianos e caspofungina. \* = Diferença estatística comparado ao controle ( $p < 0,05$ ).